

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2016

Laura Hietala

HOMOGEENISEN DEASETYLAATIO- MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Laura Hietala

HOMOGEENISEN DEASETYLAATIO- MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Soluissa tapahtuvat proteiinin translaation jälkeiset muokkaukset ovat yksi tärkeimmistä säätelytekijöistä solujen välisessä viestinnässä. Näitä muokkauksia säätelee suuri määrä entsyymejä, jotka aikaansaavat muun muassa proteiinin asetylaation, fosforylaation, sulfonaation ja metylaation. Jos proteiinin translaation jälkeistä muokkausta ei säädelä, voi tuloksena olla solujen räjähdysmäinen kasvu, geenin ilmentyminen, solukuolema, useita sairauksia ja syöpiä. Jälkitranslaatio säätelee näiden entsyymien aktivointia ja inaktivointia.

Opinnäytetyössä kehitettiin ja optimoitiin homogeeninen, vasta-aineeton menetelmä deasetylaation säätelyyn peptidisubstraateilla. Menetelmässä hyödynnettiin soluissa syntyviä leusiinivetoketjuja. Leusiinivetoketju muodostuu, kun kaksi alfa-helikaalista aminohappoketjua, joissa joka seitsemäs aminohappo on leusiini, yhdistyvät. Leusiinivetoketjut ovat yksi yleisimmistä geenien säätelytekijöistä.

Yksi deasetylaation aikaansaava ihmisestä eristetty entsyymi on sirtuiini-ryhmään kuuluva Sirtuin 1. Sirtuin 1 on NAD(+) -riippuvainen entsyymi, joka poistaa peptidiketjusta asetaattiryhmän. Tehdyssä työssä asetaattiryhmä poistettiin entsyymaattisesti substraattipeptidistä, jolloin leusiinivetoketju muodostuu europium-leimatun vastinpeptidin kanssa. Tämän johdosta saadaan suuri europium luminesenssisignaali kun pariutuva peptidirakenne suojelee europiumkelaattia sammutukselta. Reaktioon lisättiin liukoista sammutinmolekyyliä, Quench III:a, joka hiljentää europiumin signaalin, jos peptidipariutumista ei tapahdu entsyymaattisen toiminnan inhiboituessa. Reaktiosta mitattiin aikaerotteista luminesenssia QRET-tekniikalla eli sammutus-resonanssienergiansiirrolla. Systeemin validoimiseksi reaktiolle mitattiin inhibiittorititrauksella IC50-arvo, jota verrattiin kirjallisuudessa ilmoitettuun arvoon.

ASIASANAT:

deasetylaatio, peptidisubstraatti, entsyymi, lääkekehitys, seulonta

Laura Hietala

DEVELOPMENT OF HOMOGENEOUS DEACETYLTRANSFERASE ASSAY FOR HIGH THROUGHPUT SCREENING

Protein posttranslational modification is one of the most important gene regulators in cell-cell interactions. These modifications are catalyzed by a vast number of enzymes and include protein acetylation, phosphorylation, sulfonation and methylation. If for some reason posttranslational modifications are not regulated correctly, cell proliferation, gene expression, cell apoptosis, multiple diseases and cancer may follow. Posttranslational modifications are activated or inactivated by these enzymes.

In this thesis, a homogeneous, antibody-free deacetyltransferase assay was developed and optimized with peptide substrates. Leucine zippers formed inside the cell were exploited. The leucine zipper is formed when two alpha helix amino acid chains, in which every seventh amino acid is leucine, merge. Leucine zippers are one of the most common gene regulators.

One specific enzyme causing deacetylation is isolated from human cells and is called Sirtuin 1, one of the seven enzymes that belong to the sirtuin family. Sirtuin 1 is a NAD(+) dependent enzyme which removes an acetate group from a peptide. In this study, an acetate group was removed enzymatically from a peptide substrate, whereby a leucine zipper is formed together with an europium-labeled peptide. This structure protects the luminescence of europium chelate. Afterwards, the soluble quencher molecule, Quench III, is added and europium chelate luminescence is silenced if the peptide pairing does not occur when the enzymatic action is inhibited. Time-resolved luminescence was measured from the reaction by quenching resonance energy transfer (QRET) technique. A functional inhibitor was also studied. To validate the system, an IC₅₀ value was calculated by inhibitor titration and compared with a reference value found in the literature.

KEYWORDS:

deacetylation, peptide substrate, enzyme, drug development

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 PROTEIININ JÄLKITRANSLAATIO	8
2.1 Asetylaatio ja deasetylaatio	9
2.2 Fosforylaatio ja defosforylaatio	10
2.3 Sulfaatio	11
2.4 SUMOylaatio	12
2.5 Metylaatio	13
3 LEUSIINIVETOKETJU	15
4 TEORIA	17
4.1 Sirtuin 1 –entsyymi	17
4.2 EX-527 –inhibiittori	21
4.3 SRT1720 -aktivaattori	22
4.4 Europium lantanidikelaatti	23
4.5 QRET	24
5 TYÖN ALKUVALMISTELUT	26
5.1 Peptidisubstraatin valinta	26
5.2 Eu–peptidin toimivuus määrittämisessä	29
5.3 Entsyymien ja inhibiittorin valinta	30
5.4 Aktivaattori	32
5.5 QRET	33
5.6 LANCE –määrittämis menetelmä	34
6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	36
6.1 Europium–leimattu peptidi P8b	36
6.2 Sitoutumistestit	36
6.3 Deasetylaatio–reaktio	37
6.4 Inhibiittorititraus	39
6.5 Entsyymititraus	40

6.6 Labrox-laite	40
6.7 TRL-signaalien tulkinta	41
7 TULOKSET	42
8 POHDINTAA	43
LÄHTEET	44

KUVAT

Kuva 1. Proteiinin jälkitranslaation modifikaatteja (GenScript, 2016)	9
Kuva 2. Asetylaatio ja deasetylaatio (Cayman Chemicals, 2016.)	10
Kuva 3. Fosforylaation ja defosforylaation peruseriaate (Thermo Fisher Scientific, 2015).	11
Kuva 4. Tyrosiinisulfaation periaate (Yogita & Muayyad, 2013).	12
Kuva 5. SUMOylaatio ja deSUMOylaatio (Boston Biochem, 2016)	12
Kuva 6. Metylaation periaate. (Aletta ym. 1998)	13
Kuva 7. Alfa-heliksi -sekundäärirakenne (ChemGuide, 2012)	15
Kuva 8. Leusiinivetoketju (Nakoshima, 2005)	16
Kuva 9. Entsyymien toimintaperiaate (BBC, 2016)	17
Kuva 10. Sirtuin 1 -entsyymin molekyylirakenne (NCBI, 2014)	18
Kuva 11. Sirtuin 1:n oleelliset domeenit kuvattuna (Cantó & Auwerx, 2012)	19
Kuva 12. NAD(+) -riippuvaisen deasetylaation toimintaperiaate (Gertz ym. 2013)	20
Kuva 13. Inhibiittori EX-527:n molekyylirakenne.	21
Kuva 14. Aktivaattori SRT1720 molekyylirakenne (Cayman Chemicals, 2016)	22
Kuva 15. QRET-tekniikka sovellettuna deasetylaatioissa.	24
Kuva 16. Leusiinivetoketjun perusrakenne (Oregon State University, 2012).	27
Kuva 17. Peptidisubstraatin valinta. Pep 1 ja P8c titrattiin Eu28 –peptidin kanssa, jotta saatiin selville mikä konsentraatio antaa parhaan S/B –lukeman.	28
Kuva 18. Eu-peptidien S/B -arvojen tarkastelu.	29
Kuva 19. Sirtuin 1 -entsyymin titraus. Tulokset TRL-signaaleina.	31
Kuva 20. Sirtuin 1 -entsyymin titraus. Analyysissä oli mukana inhiboidut reaktiot, joista laskettiin signaalin ja taustan suhde	32
Kuva 21. LANCE-määritysmenetelmä.	34
Kuva 22. Eri peptidisubstraattien vertailu.	38
Kuva 23. Inhibiittorititraus.	39
Kuva 24. Labrox-levynlukija (Labrox.fi).	40
Kuva 25. Europium-kelaatin luminesenssin mittaustulokset.	41
Kuva 26. Sirtuin 1 -entsyymin inhibiitio.	42

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Ac	Asetaattiryhmä
Ac-CoA	Asetyylikoentsyymi A
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
CD4 ⁺ CD8 ⁺	T-solujen reseptori
Cox 2	Syklo-oksigenaasi 2
IC50	Se inhibiittorin konsentraatio, jolla saadaan 50%:a reaktioista inhiboitua.
L002	Työssä tutkittu Sirtuin 1 -inhibiittori
Luminofori	Yhdiste, joka emittoi valoa altistuessaan valonlähteelle.
NAD(+)	β-Nikotiiniamidi adeniini dinukleotidi-hydraatti
P8b	Europium-leimattu peptidi.
P8c	Peptidiketju, jonka sekvenssissä ei ole asetaattiryhmiä.
Pep1	Peptidiketju, jonka sekvenssissä on asetaattiryhmä.
PTM	Posttranslationaaliset modifikaatiot
QRET	Sammutus-resonanssienergiansiirto -tekniikka
Quench III	Työssä käytetty liukoinen sammutinmolekyyli
S/B	Signaalin ja taustan suhde, signal-to-background -ratio
Suramin Sodium	Työssä tutkittu Sirtuin 1 -inhibiittori
TRL	Aikaerotteinen luminesenssi

1 JOHDANTO

Proteiinin translaation jälkeiset muokkaukset ovat solun sisäisiä tapahtumia, joita säätelymekanismit ohjaavat. Nämä posttranslacionaaliset muokkaukset vaikuttavat proteiini-proteiini –interaktioon, proteiinin lopulliseen rakenteeseen sekä solussa tapahtuviin reaktioihin. PTM:issa proteiinin aminohappojen rakennetta muokataan kovalenttisesti. (Prabakaran et al. 2012.)

Turun yliopistossa on käynnissä tutkimus, jonka tarkoituksena on kehittää universaali biokemiallinen entsyymiaktiivisuus – menetelmä proteiinien translaation jälkeisiä muokkauksia varten. Mittauksissa hyödynnetään Turun yliopistossa kehitettyä QRET–tekniikkaa, ja tarkoituksena onkin esittää sen soveltuvuus laajaa lääkeaineiden seulontaa varten.

Proteiinin jälkitranslaatio on seurausta solun sisäisten entsyymien tekemistä muokkauksista. Jos tämä entsyymi tekee muokkauksen väärään kohtaan aminohapposekvenssiä voi seurauksena olla useita eri sairauksia, pahimmillaan jopa syöpä, riippuen siitä, mikä jälkitranslacionaalinen muokkaus on kyseessä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia deasetylaatiota *in vitro* – olosuhteissa, ja saada tämä reaktio inhiboitua. Kun oikea inhibiittori löydetään ja reaktion olosuhteet saadaan optimoitua, voidaan inhibiittoriseulontaa hyödyntää tulevaisuuden lääkeaineiden kehitykseen.

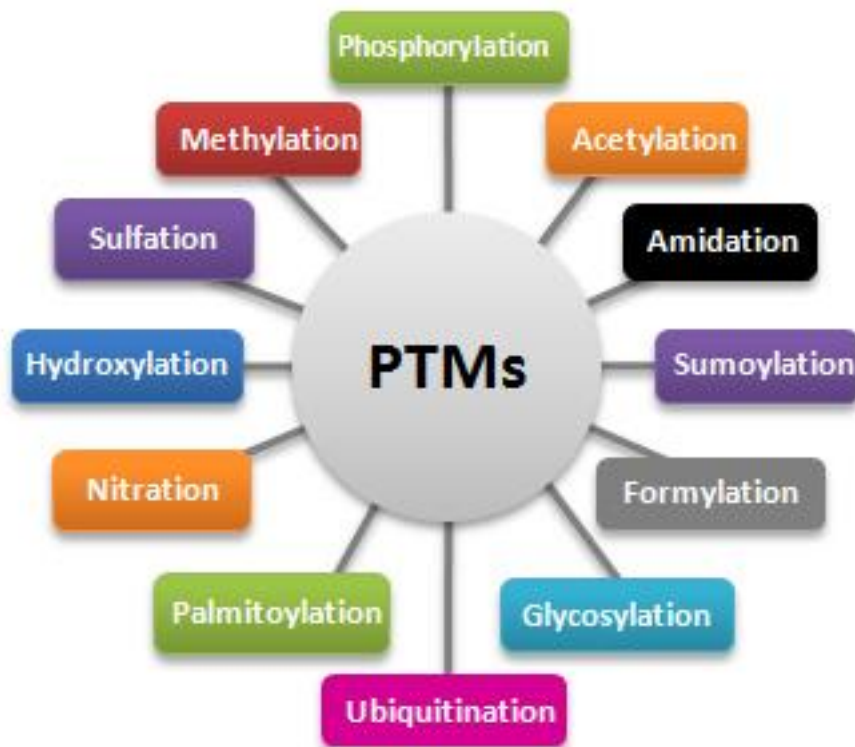
Opinnäytetyössä tutkittiin deasetylaatiota leusiinivetoketjuissa, jotka ovat olennainen osa geenien säätelyä. Deasetylaatiota aikaansaatiin Sirtuin 1 -nimisellä entsyymillä, joka irrottaa peptidiketjusta asetaattiryhmän. Tarkoituksena oli kehittää menetelmä, joka soveltuu deasetylaation tehoseulontaan.

2 PROTEIININ JÄLKITRANSLAATIO

Proteiinin translaation jälkeiset muokkaukset määräävät proteiinin lopullisen muodon ja oleellisesti vaikuttavat sen tehtävään solussa ja proteiinien väliseen viestintään. Proteiinisynteesi on tapahtuma, jossa solu valmistaa proteiineja sen tumassa olevan DNA:n emäsjärjestyksen mukaisesti. Proteiinisynteesistä erotetaan kaksi vaihetta: transkriptio ja translaatio. Transkriptiossa DNA:n emäsjärjestyksen mukaan tehdään sitä vastaava lähetti-RNA. Translaatiossa lähetti-RNA siirtyy tumasta solulimaan kiinnittyen sytosolissa vapaana olevaan ribosomiin. Ribosomi alkaa valmistaa aminohapoista pitkiä ketjuja polymeeriksi. Kun koodaus on valmis, polypeptidiketju laskostuu ja siihen tehdään mahdollisuuksien mukaan jälkitranslationaalisia muokkauksia. (Lodish, ym. 2000.)

Kun solussa valmistuu polypeptidiketju, solunsisäiset entsyymit muokkaavat proteiinin lopulliseen muotoonsa. Muokkaukset kohdistuvat proteiiniketjun aminohappojen sivuketjuihin tai peptidisidoksiin yleisesti entsyymin aikaansaamina, joko poistamalla tai lisäämällä jonkun funktionaalisen ryhmän. Näitä muokkauksia ovat muun muassa glykosylaatio, asetylaatio, fosforylaatio, SUMOylaatio ja sulfonaatio. PTM:t vaikuttavat proteiinin lopulliseen molekyylimassaan, solujenväliseen viestintään ja niiden toimintaan soluissa. Tämän lisäksi niillä on olennainen rooli geenien ilmentymiseen, signaalin välityksessä, solun aineenvaihdunnassa, DNA:n korjauksessa sekä solunulkoisen ja -sisäisen viestinnän hallitsemisessa. PTM:n toimintaa onkin siksi tärkeää tutkia, sillä monen proteiinin, joissa tapahtuu PTM:ta, tiedetään olevan osallisena monien sairauksien, kuten syöpien, diabeteksen ja sydäntautien syntyyn. Siksi onkin tärkeää pystyä kontrolloimaan entsyymien aktivointia ja inhiboimista, ja löytää sopivia menetelmiä tehoseulontaan.

Tässä kappaleessa käsitellään yleisimpiä posttranslacionaalisia muokkauksia, jotka ovat asetylaatio ja deasetylaatio, fosforylaatio ja defosforylaatio, sulfaatio, metylaatio ja SUMOylaatio. Muut jälkitranslaation muodot on lueteltuna kuvassa 1.



Kuva 1. Proteiinin jälkitranslaation modifikaatteja (GenScript, 2016)

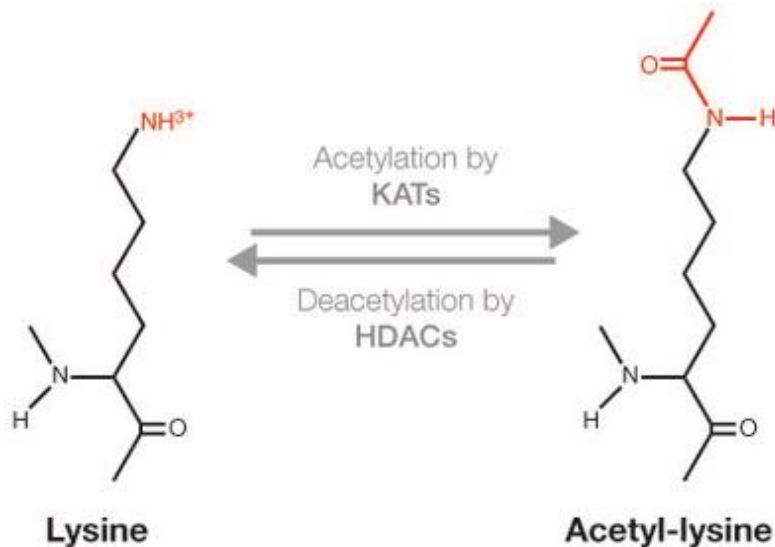
2.1 Asetylaatio ja deasetylaatio

Asetylaatio on yksi proteiinin jälkitranslaation muodoista. Siinä entsyymi siirtää peptidiketjulle määrättyyn yhteen tai useampaan paikkaan asetaattiryhmän. Asetyyli transferaasit katalysoivat yhden asetaattiryhmän siirtoa asetyylikoentsyymi A:lta lysiniin terminaaliseen amiiniin (Cayman Chemical, 2016). Asetyyli transferaasit ovat siis entsyymejä, jotka siirtävät funktionaalisen ryhmän, tässä tapauksessa asetaattiryhmän. Tunnetuin asetylaatiota aikaansaava entsyymi on p300. Kun proteiinissa tapahtuu asetylaatio, sen rakenne muuttuu ja samoin sen interaktiot muiden biomolekyylien kanssa. Asetylaatio siis aktivoi proteiinin, tai proteiinista riippuen saattaa myös inaktivoida sen.

Deasetylaatio on vastakkainen tapahtuma asetylaatiolle. Deasetyyli transferaasi eli tässä opinnäytetyössä käytetty, ihmisestä eristetty Sirtuin 1 –entsyymi irrottaa asetaattiryhmän lysiniin terminaalisisesta amiinista. Suurella Sirtuin 1 –konsentraatiolla solussa on huomattu olevan yhteys diabeteksen syntyyn. Sirtuin 1 sijaitsee solussa sekä tumassa että solulimassa. Sirtuiinin toimintaa aktivoi solunsisäisen NAD(+) –kompleksin kasvanut konsentraatio, jolloin se saattaa aikaansaada deasetylaation proteiinissa. Deasetylaatio

muokkaa proteiinin rakennetta inaktivoimalla sen ja muuttamalla proteiini-proteiini –välisiä suhteita. (Cayman Chemicals, 2016; Turkmen ym. 2014.)

Kuvassa 2 nähdään lysiini-aminohapon asetyloiminen ja deasetyloiminen.

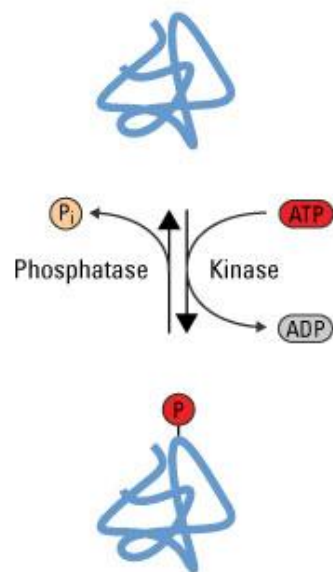


Kuva 2. Asetylaatio ja deasetylaatio (Cayman Chemicals, 2016.)

Reaktio on reversiibeli eli palautuva ja toimii kumpaankin suuntaan. KAT tarkoittaa tässä yhteydessä lysiinin asetyylitransferaaseja ja HDAC histonin deasetylaaseja. Histonin deasetylaasit ovat yleisnimitys deasetylaation aikaansaaville entsyymeille, sillä niiden parhaiten tunnettuja substraatteja ovat histoni-proteiinit. (Cayman Chemicals, 2016.)

2.2 Fosforylaatio ja defosforylaatio

Yksi yleisimmistä soluissa tapahtuvista PTM:sta on fosforylaatio. Fosforylaatio joko aktivoi tai inaktivoi proteiinin, sekä muuttaa proteiinin konformaatiota eli sen kolmiulotteista rakennetta. Fosfaattiryhmän suuren negatiivisen varauksen ansiosta se muuttaa proteiinin hydrofiiliseksi. Kinaasit poistavat fosfaattiryhmän ATP:ltä eli adenosiinitrifosfaatilta, siirtävät sen peptidiketjuun ja fosfataasit poistavat fosfaattiryhmän. Fosforylaation tärkeitä rooleja ovat solusyklin säätely ja osallistuminen apoptoosiin eli solukuolemaan.

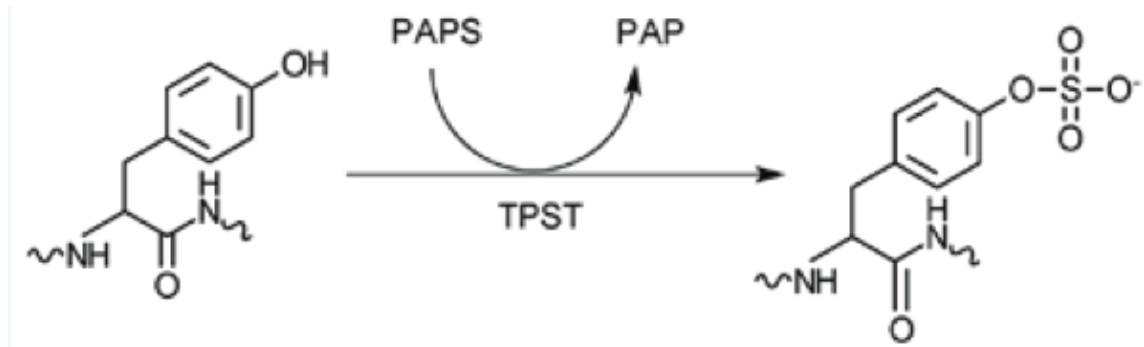


Kuva 3. Fosforylaation ja defosforylaation peruseriaate (Thermo Fisher Scientific, 2015).

Proteiinista riippuen fosforylointi joko aktivoi tai inaktivoi proteiinin. Kinaasina voi toimia monikin entsyymi, sillä ihmisen genomista on tähän päivään mennessä löydetty yli 500 kinaasia. Fosfataasientsyymejä on genomissamme noin. 150. (ThermoFisher Scientific 2016.)

2.3 Sulfaatio

Sulfaatio on yksi proteiinin jälkikäsittelyn muodoista, jossa entsyymi liittää sulforyhmän toiseen molekyyliin. Sulfaatio on osana virusten tunkeutumisessa soluun, ja sillä on monia vaikutuksia ihmisen patologiassa ja fysiologiassa. Yksi yleisimmistä sulfaation muodoista on tyrosiinin sulfaatio, jossa entsyymi liittää proteiinin tyrosiinin hydroksyyliipäähän sulforyhmän. Entsyymit jotka saavat aikaan sulfaation, kutsutaan TPST:ksi eli tyrosiini-proteiinisulfotransferaaseiksi.

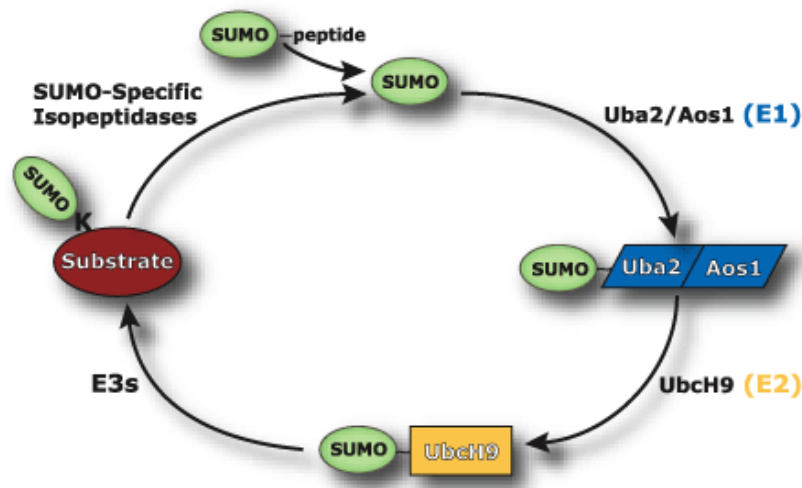


Kuva 4. Tyrosiinisulfaation periaate (Yogita & Muayyad, 2013).

TPST siirtää sulforyhmän 3'-fosfoadenosiini-5'-fosfosulfaatilta, yleisluovuttajalta (PAPS) proteiinin tyrosiinipäähän, johtaen tyrosiini O sulfoesterin ja 3',5'-ADP:n muodostumiseen. (Kanan & Al-Ubaidi, 2013.)

2.4 SUMOylaatio

SUMOylaatio säätelee solunsisäisiä prosesseja. Sumolaatiossa liitetään kovalenttisesti SUMO (*Small Ubiquitizing-like modifier*)-proteiini lysiini-aminohapon aminotermiiniin. Kolmiosainen entsyymi, sisältäen E1, E2 ja E3 liittää SUMOn proteiiniin sen C-terminaalista. Kuvassa 5 on esitetty SUMOylaation ja deSUMOylaation syklit.

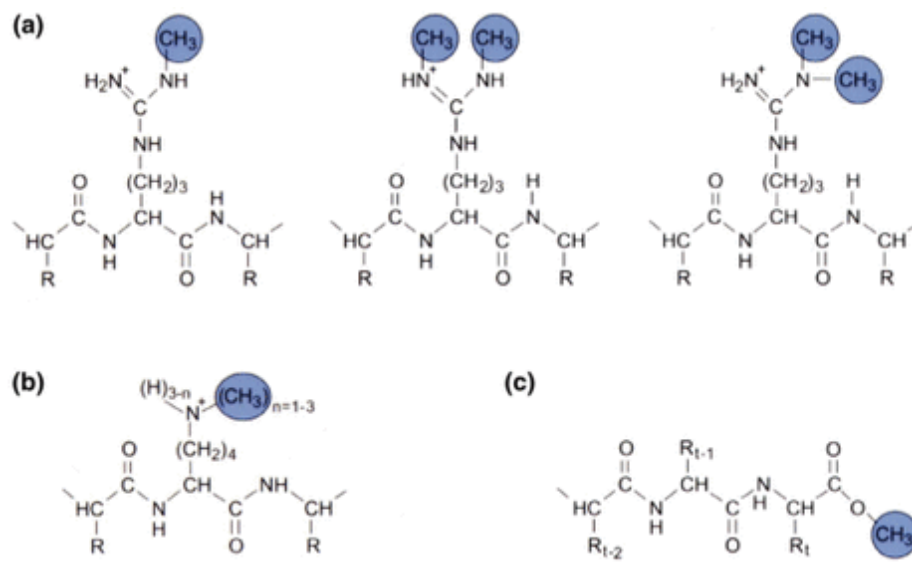


Kuva 5. SUMOylaatio ja deSUMOylaatio (Boston Biochem, 2016)

Kokonaisuudessaan SUMOylaation tapahtuminen vaatii yhteensä kolmen eri entsyymin osallistumista. Kuten kuvasta nähdään, reaktio on palautuva eli reversiibeli. SUMOylaatio vaikuttaa proteiinin molekyyliinmassaan, ja sen ubikitiinin kaltaisen rakenteen vuoksi se ikään kuin suojelee proteiinia proteaasimolekyyliltä. (BostonBiochem, 2016.)

2.5 Metylaatio

Metylaatioissa siirtyy esteröintireaktion avulla metyyliryhmä mm. lysiniin, arginiiniin tai histidiiniin vapaisiin sivuketjuihin. Metylaatio liittyy vahvasti solun ikääntymiseen liittyviin reaktioihin, solujen korjaamiseen ja aliravitsemuksesta tai nestehukasta aiheutuvan, solun sisäisen stressin, välittymiseen. N-metylaatiota, jossa CH_3 -ryhmä kiinnittyy aminohapon sivuryhmien vapaaseen aminoterminaaliin, pidetään irreversiibelinä eli palautumattomana jälkitranslationaalisena reaktiona.



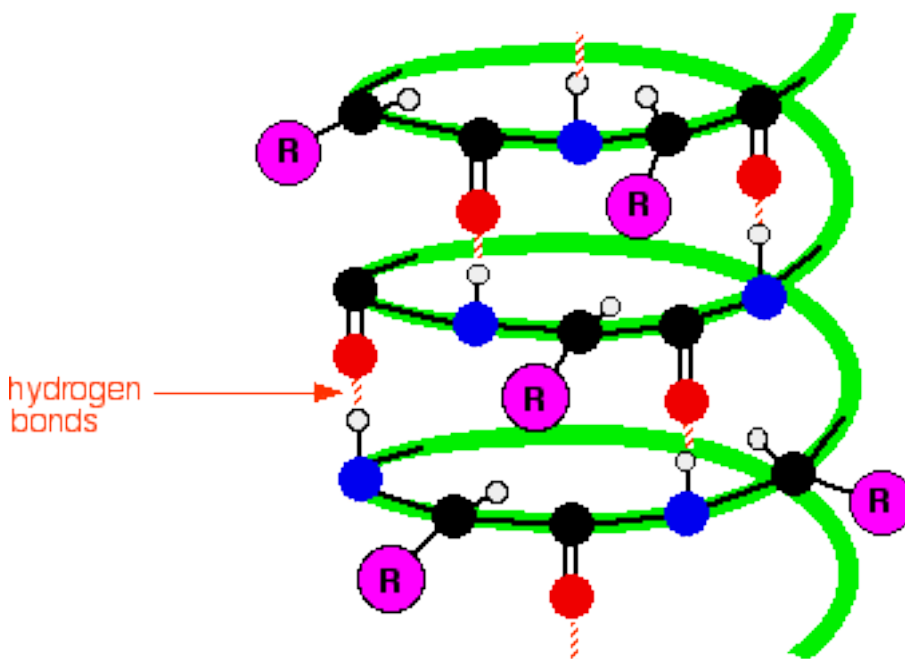
Kuva 6. Metylaation periaate. (Aletta ym. 1998)

Kuvassa 6 kohdassa a) arginiinin metylointi. Tämä aminohappo voidaan joko mono- tai dimetyloidä, joko symmetriseen tai asymmetriseen muotoon. Tällöin useampi kuin yksi metyyliryhmä kiinnittyy sivuryhmään kovalenttisella sidoksella. Kohdassa b) lysiniin ϵ -typpi voi metyloitua kolmella eri tavalla, jolloin puhutaan mono-, di- ja trimetylaatiosta.

Viimeisessä kuvassa on esimerkki G-proteiinista, jonka on mahdollista metyloitua normaalista poikkeavalla tavalla, eli sen karboksyyliyhmän C-terminaalissa. (Aletta ym. 1998.)

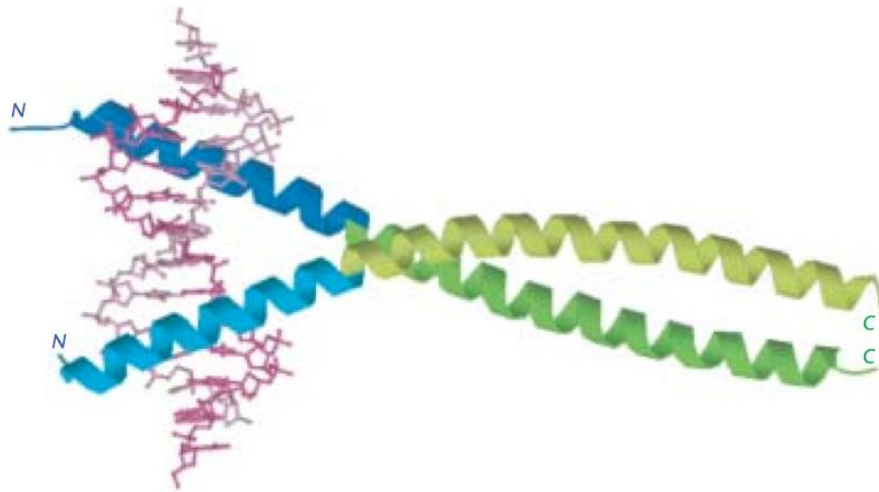
3 LEUSIINIVETOKETJU

Opinnäytetyössä tutkittiin deasetylaation tapahtumista leusiinivetoketjuilla. Leusiinivetoketjut muodostuvat kahdesta alfa-helikaalisessa konformaatioissa olevasta proteiinista, joissa joka seitsemäs aminohappo on leusiini. Alfa-heliksi on yksi proteiinin sekundääri-rakenteista, joihin se laskostuu aminohappoketjurakenteen valmistuttua. Alfa-heliksi -konformaatiot antavat proteiinille suojellun rakenteen muodostamalla hydrofiilisen ulko-kuoren sivuketjujen negatiivisesti varautuneiden ryhmien vuoksi. Rakenteen sisäpuolella on hydrofobinen ydin. Jos tavoitellaan mahdollisimman stabiilia proteiinirakennetta, yksinkertainen tapa on yhdistää kaksi alfa-heliksi -proteiinia toisiinsa. Tällöin sivuketjujen vuorovaikutukset maksimoituvat.



Kuva 7. Alfa-heliksi -sekundäärirakenne (ChemGuide, 2012)

Alfa-heliks rakenteessa kierteessä on tyypillisesti 11 aminohappoa, ja vetysidokset syntyvät N-H ja C=O sidosten välille. Sivuryhmät (Kuvassa 7 R) sijoittuvat kierteen ulkopuolelle, jolloin ne pääsevät reagoimaan parhaiten ympäristön kanssa. Rakenteen sisäpuolella on hydrofobinen ydin.



Kuva 8. Leusiinivetoketju (Nakoshima, 2005)

Vetoketjun aminotermiinaalit kiinnittyvät DNA-molekyyliin. Kuvassa 7 sininen osa vetoketjurakenteesta on niin kutsuttu emäksinen alue. Kuvan vihreä alue sisältää leusiinivetoketjun, joka voi olla satoja aminohappoja pitkä. Emäksinen alue helpottaa vetoketjun kiinnittymistä DNA:han sen sisältämien negatiivisesti varautuneiden fosfaattiryhmien vuoksi. Leusiinit muodostavat toistensa välille heikkoja vuorovaikutuksia, eivätkä täten siis kiinnity kovalenttisesti toisiinsa. (Nakoshima, 2005.)

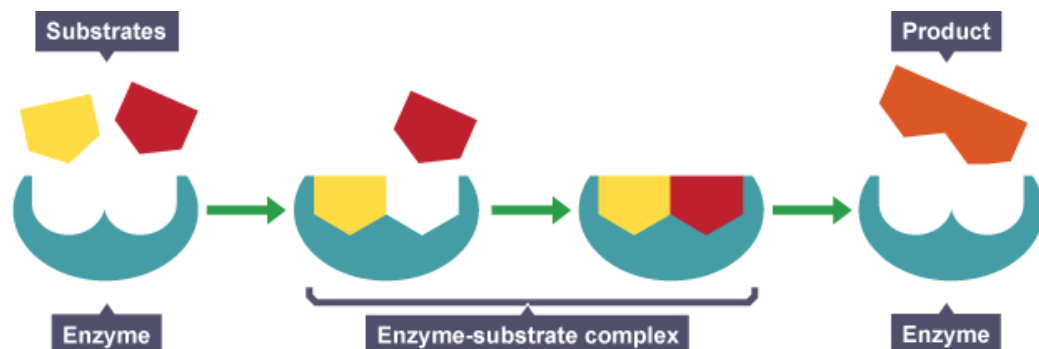
Opinnäytetyössä yhdistettiin toisiinsa leusiinivetoketjurakenteeseen europium-leimattu peptidi sekä kohdepeptidi, jonka asetaattiryhmä aminohapposekvenssistä pyrittiin poistamaan. Kun leusiinivetoketjurakenne muodostuu näiden peptidien välille, europium jää suojeltuun tilaan rakenteen sisälle ja sammutinmolekyyli ei pääse vuorovaikutuksiin europiumin kanssa.

4 TEORIA

Tässä luvussa käsitellään lähemmin deasetylaatiossa käytettävien reagenssien, entsyymin, inhibiittorin ja aktivaattorin toimintaperiaate.

4.1 Sirtuin 1 –entsyymi

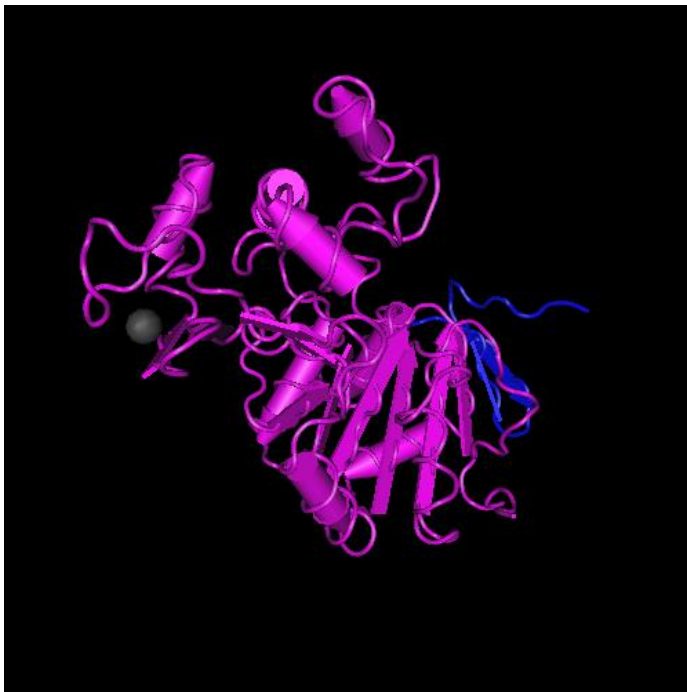
Entsyymit ovat reaktiota nopeuttavia katalyyttejä. Ne ovat proteiineja, jotka toimivat reaktioiden katalyytteinä. Ne eivät muuta reaktiotasapainoa tai reaktiotietä, vaan ainoastaan saavat aikaan reaktion nopeutumisen. Entsyymiin kuuluu sen proteiiniosa, apoentsyymi, sekä aktiivisuuden aikaansaavia molekyylisiä, joita kutsutaan kofaktoreiksi tai koentsyymeiksi. Näiden kahden välisenä erona on, että kofaktorina voi toimia jokin epäorgaaninen molekyyli kuten metalli-ioni, kun taas koentsyymit ovat useimmiten orgaanisia molekyylejä. Ilman entsyymejä reaktioon saattaisi kulua useita tunteja, jopa päiviä. Entsyymeitä hyödyntämällä saadaan alennettua reaktion aktivaatioenergiaa, jonka ylityminen on edellytys reaktion käynnistymiseen. Entsyymit eivät kulu reaktioissa. (Lodish, ym. 2000)



Kuva 9. Entsyymien toimintaperiaate (BBC, 2016)

Kuvassa 9 on esitetty entsyymien perustoimintaperiaate. Entsyymien apoentsyymiosassa on aktiivisia, substraattispesifisiä kohtia, joihin vain tietyn rakenteen omaava substraatti pystyy kiinnittymään. Substraatin kiinnittyminen entsyymiin katalysoi reaktion, jossa syntyy tuotetta, tai vastaavasti entsyymi-substraatti -kompleksi voi toimia itsessään reaktion katalyyttinä.

Ihmisestä on löydetty sirtuiini -perheeseen kuuluvia entsyymejä 7 kappaletta, Sirt1, Sirt2... - Sirt7. Opinnäytetyö keskittyy Sirtuin 1 -entsyymiin. Sirtuin 1 on NAD(+) –riippuvainen histoni-deasetylaasi. Tarpeeksi korkea solunsisäinen NAD(+) –konsentraatio aktivoi tämän entsyymin. Sirtuin 1:n väärään paikkaan suunnattu geenin säätely voi johtaa ennenaikaiseen ikääntymiseen, diabetekseen ja pahimmillaan jopa syöpään. Aiheuttamansa deasetylaation myötä Sirtuin 1 liittyy moniin solunsisäisiin tapahtumiin, kuten solujen kasvuun, solujen väliseen viestintään, DNA:n korjaukseen ja nekroosiin. Entsyymillä on mahdollisuus toimia tyypin 2 diabeteksen ja syövän hoidon osana inhibiittori-seulonassa. (Sun ym. 2015, 1.)

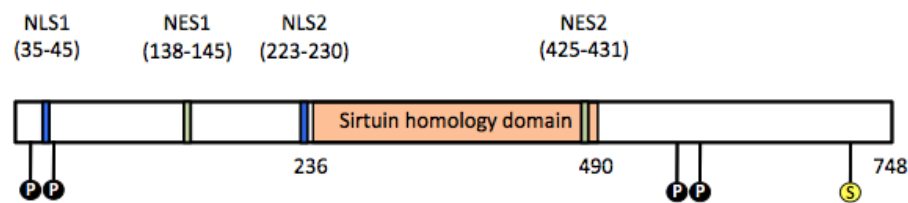


Kuva 10. Sirtuin 1 -entsyymin molekyylirakenne (NCBI, 2014)

Entsyymiä löytyy ihmiskehosta korkeina pitoisuuksina sydäimestä, aivoista ja luustolihak-sistosta. Pienissä määrin sitä ilmenee myös munuaisissa ja keuhkoissa. Sirtuin 1:n on katsottu olevan osallisena myös immuunijärjestelmän T-solujen kehityksessä, sillä sitä on löydetty kateenkorvasta, pernasta sekä imusolmukkeista suurina pitoisuuksina, var-sinkin CD4⁺CD8⁺ -solujen läheisyydessä. (Kong ym. 2013.)

Esimerkkinä entsyymien liittymisestä immuunijärjestelmään vuonna 2010 tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että Sirtuin 1:n liian suuri ilmentyminen vähentää Cox-2:n mRNA – tasoa, joka on vatsakalvon makrofagien kohdegeeni. Seurauksena tästä havaittiin prostaglandiini E:n väheneminen makrofageissa, joka taas aiheuttaa vakavia seurauksia makrofagien tulehduksiin ja kasvaimiin liittyviin toimintoihin. (Kong ym. 2013, 4.)

Sirtuin 1 on entsyymi, joka vaatii toimiakseen NAD(+):a. Entsyymi havaitsee solunsisäisen NAD(+) –tason nousun, joka heijastaa solun energiatasoa. Sen aktivoiminen kasvattaa mitokondriaalista aineenvaihduntaa ja antioksidanteilta suojaamista. Sirtuin 1:ssä on sirtuiineille tyypillinen, katalyyttinen suojeltu ydin, sekä N- ja C-terminaaleja laajentaen entsyymien kokoa noin 240 aminohapon verran. Nämä laajennukset toimivat säätelyproteiinien ja substraattien toiminta-alustana.

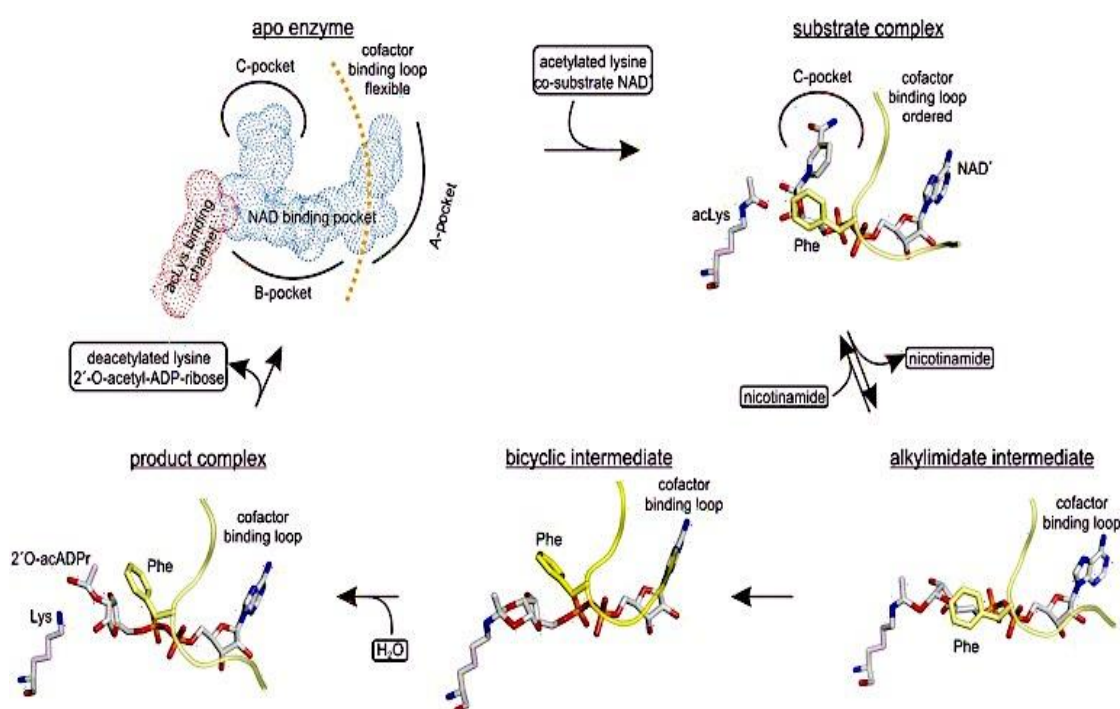


Kuva 11. Sirtuin 1:n oleelliset domeenit kuvattuna (Cantó & Auwerx, 2012)

Kuvasta 11 nähdään Sirtuin 1:n aminohappoketjun pituus, 748 aminohappoa. Ketjussa on kaksi NLS-aluetta, joita kutsutaan *nuclear localization signal*:ksi, sekä kaksi NES-aluetta, *nuclear exportation signal*. Promootori kiinnittyy tarpeen vaatiessa NLS tai NES -alueille, aktivoiden entsyymien siirtymisen joko tumasta sytosoliin tai sytosolista tumaan, missä sillä on solun sisällä tarvetta. (Cantó & Auwerx, 2012.)

Tämän entsyymien toimesta tapahtuva deasetylointi voi johtaa suoraan säätelytekijöiden aktivointiin tai inhiboimiseen. Suurin osa Sirtuin 1:n kohteista onkin aineenvaihdunnan säätelytekijöitä, josta voidaan juontaa siihen, että Sirtuin 1 toiminnallaan säätelee kehon energian käyttöä ja energiatasapainoa. Ylipainoisilla hiirillä ja ihmisillä huomattiin esimerkiksi tämän entsyymien tason laskua. Perustutkimuksissa huomattiin, että jo pelkästään entsyymien konsentraation suurella nostolla soluissa ja kudoksissa saatiin aikaan korkeampi entsyymiaktiivisuus, ilman NAD(+) -tason nostoa. (Cantó & Auwerx, 2012.)

NAD(+) ja asetyloitu lyysiini peptidisubstraatissa sitoutuvat aktiivisen osan vastakkaisille puolille katalyyttisen ytimen ympärille. Kun peptidi kiinnittyy, muodostuu proteiiniin ”kofaktorin kiinnittymiskohta” (*cofactor binding loop*) sen perusteella, mihin NAD(+):n on tarkoitus sitoutua. NAD(+) -alue voi vaihdella, mutta esimerkiksi asetyylihapen ja ADP 1' riboosin alkylimediaatin esiasteen muodostuessa tämä alue vaikuttaisi sijaitsevan entsyymin suojellussa C-taskussa. Esiasteen muodostumisen jälkeen NAD(+) irtoaa C-taskusta ja esiaste järjestyy 1' 2' -sykliseen muotoon ja samalla muodostaen 2'-O-asetyyli-ADP -riboosin ja deasetyloidun polypeptidin (Gertz ym. 2013). Kuvassa 12 on esitetty entsyymin toimintaperiaate rakennetasolla.



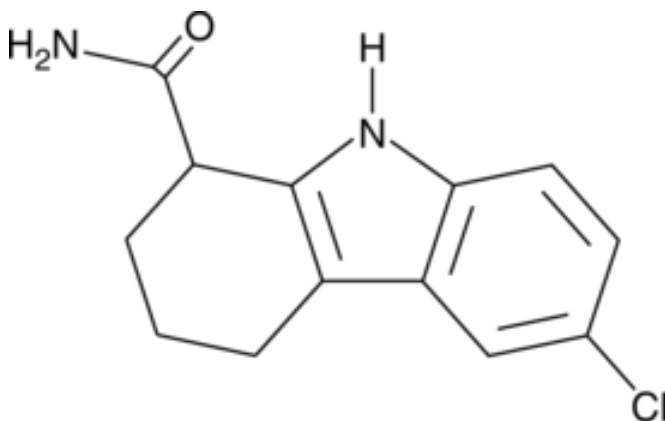
Kuva 12. NAD(+)-riippuvaisen deasetylaation toimintaperiaate (Gertz ym. 2013)

Sirtuiinista riippuen toimintaperiaate on lähes sama. Ensimmäisessä kuvassa on tarkastelussa apoentsyymi, yksittäinen osa koko entsyymistä. Apoentsyymissä nähdään C-tasku, asetyloidun lyysiinin kiinnittymiskohta sekä kofaktorin kiinnittymisalue. Ac-lysiinin ja NAD(+)-kiinnittymisen jälkeen nähdään, kuinka kofaktorin kiinnittymisalue muodostuu tiettyyn kohtaan entsyymistä, riippuen siitä, mihin kohtaan entsyymiä NAD(+) ja Ac-lyysiini kiinnittyvät. Lysiini kiinnittyy, kun nikotiiniamidi reagoi yhdisteen kanssa ja tästä aiheutuen C-tasku irtoaa rakenteesta. Entsyymien rakenne alkaa muuttua, ja tässä vaiheessa

sitä kutsutaan alkyyylimidaatin esiasteeksi. Esiaste järjestyy sykliseen muotoon ja yhdisteen reagoidessa veden kanssa asetyloitu, kiinnittynyt lyysiini irtoaa entsyymistä ja asestaattiryhmä muodostaa entsyymin toissijaisen tuotteen, 2'-O-Ac-ADP -riboosin. (Gertz ym. 2013.)

4.2 EX-527 –inhibiittori

Inhibiittorit ovat entsyymin toimintaa estäviä eli inhiboivia proteiinikomplekseja. Inhibiittorit kilpailevat kiinnittymisestä entsyymin aktiiviseen kohtaan substraatin kanssa täten mahdollisesti estäen substraatin kiinnittymisen entsyymiin. Opinnäytetyössä käytettiin Sirtuin 1-entsyymille selektiivistä eli valikoivaa inhibiittoria EX-527, joka pystyy inhiboimaan myös muita sirtuiini-ryhmään kuuluvia entsyymejä, mutta se vaatii silloin normaalia suuremman konsentraation toimiakseen. Se pystyy läpäisemään solukalvon, mikä on erityisen tärkeää, ottaen huomioon deasetylaation tapahtuvan solun sisällä.



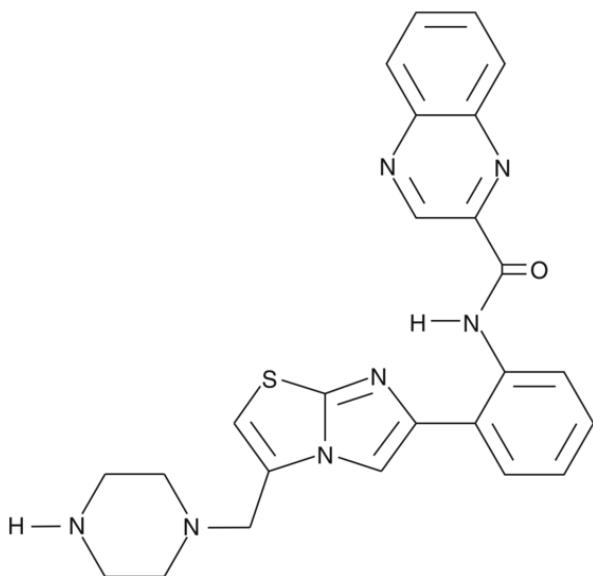
Kuva 13. Inhibiittori EX-527:n molekyyli rakenne.

Kinetiikkatutkimuksissa (Gertz ym. 2013) on havaittu, että inhibiittori sallii alkyyylimidaatin muodostumisen sekä nikotiiniamidin vapautumisen entsyymistä ennen katalyyysin estämistä. Jos nikotiiniamidi kiinnittyy uudelleen tähän samaan vapautumiskohtaan, se johtaa substraatin uudelleenrakennukseen, ja tämä taas aiheuttaa deasetylaatio-reaktion inhiboimisen.

Peptidisubstraatin kiinnittyminen ei ole välttämätöntä EX-527 kiinnittymiseen, mutta NAD(+) toimii välttämättömänä "avustavana" ligandina. EX-527 havaittiin tutkimuksissa kiinnittyvän entsyymin C-taskuun, joka toisaalta sisältää NAD(+):sta irronneen reagoimattoman nikotiiniamidin. Inhibiittorin kiinnittyminen tähän C-taskuun estää entsyymiä deasetyloimasta peptidisubstraattia, eli kyseessä on kilpaileva kiinnittyminen entsyymin aktiiviseen kohtaan. (Gertz ym. 2013.)

4.3 SRT1720 -aktivaattori

SRT1720 on Sirtuin 1:n selektiivinen aktivaattori, joka parantaa entsyymin toimintaa. Gano et.al (2014) huomasivat, että entsyymin aktiivisuuden ja ekspression vähentäminen ikääntymisen seurauksena aiheuttaa varsinkin verisuoniston endoteelisoluihin muutoksia. Tästä syystä onkin tutkittu entsyymin ekspression parantamista sen aktivaattorin, SRT1720:n avulla lääkeaineterapian osana (Gano ym. 2014.). Gano ym. huomasivat tutkimuksissaan Sirtuin 1:n suoran aktivoinnin SRT1720:n avulla parantavan verisuonien toimintahäiriöitä ja vähentäen ikääntymisen myötä seuraavia tulehduksia. Ylipainosta ja ikääntymisestä johtuvien sairauksien hoitoon on haettu hoitokeinoksi tämän aktivaattorin hyödyntämistä. Kehon rasvaprosentilla on havaittu olevan yhteys solujen ennenaikaiseen ikääntymiseen, etenkin edistämällä tulehduksia, mutta myös tukahduttamalla pitkäikäisyysgeenien, kuten Sirt 1:n, ilmenemisen. (Minor ym. 2011.)



Kuva 14. Aktivaattori SRT1720 molekyyli rakenne (Cayman Chemicals, 2016)

Aktivaattoria on tapana käyttää reaktion nopeusvakion nostamiseksi mutatoituneilla tai muokatuilla entsyymeillä.

4.4 Europium lantanidikelaatti

Normaalisti homogeenisissä määrytyksissä on ongelmana tuloksia analysoitaessa taustan aiheuttama signaali, kun analyyyttiä ei ole liuoksessa läsnä. Tämä rajoittaa menetelmän herkkyyttä ja sen soveltuvuutta erilaisiin määrittämenetelmiin. Hyödylliseksi havaittu keino minimoida taustan aiheuttama signaali on käyttää määrytyksissä lantanidikelaatti-leimamolekyylejä. Lantanideilla eli maametalleilla on pitkä luminesenssin elinikä verrattuna muihin yleisesti käytettyihin fluorofooreihin. Tämä mahdollistaa taustan lyhytikäisen luminesenssin erottamisen oikeasta signaalista. Opinnäytetyössä käytettiin europium lantanidikelaattia. Muita yleisesti käytettyjä lantanideja ovat samarium (Sm), terbium (Tb) ja dysprosium (Dy). Jotta lantanidien pitkä luminesenssin elinikää saataisiin hyödynnettyä, ne tulee liittää ligandiin, jolloin muodostuu kelaatti. Kelaatti on stabiili rakenne, jolloin sitä voidaan hyödyntää leimamolekyyleinä. Tällä lantanidikelaatti-kompleksilla saavutetaan mittausmenetelmälle parempi herkkyys ja laajemmat käyttömahdollisuudet.

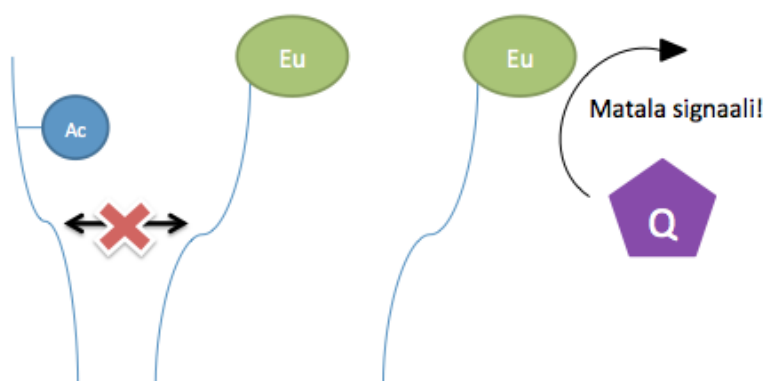
Europium kelaatti absorboi valoa aallonpituudella 340 nm ja emittoi aallonpituudella 616 nm. Taustan signaali voi johtua monesta eri osasta: kuoppalevystä, itse luminoivasta reagenssista reaktioliuoksessa sekä reaktion aikaansaavista komponenteista. Opinnäytetyössä yksi taustan luminenssia aiheuttava molekyyli on NAD(+), jota deasetylaatiassa tarvitseva entsyymi käyttää. NAD(+):n elinikä on suhteellisen lyhyt verrattuna europiumiin, joten oikeaa mittausviivettä käyttämällä saadaan aikaan tulos, joka on samanaikaisesti sekä herkkyydeltään että selektiivisyydeltään hyvä. (Hagan & Zuchner, 2011.)

Opinnäytetyössä käytettäviin peptidisubstraatteihin tehtiin leimaus yliopistolla. On olemassa kaksi yleistä keinoa, jota käytetään kelaatin kovalenttisessä kiinnittymisessä peptidiin. Ensimmäisessä se liitetään lysiinin aminoryhmiin tai kysteiinin tioleihin. Opinnäytetyön peptideissa oli lysiiniä, joten peptidin leimaaminen onnistui täten hyvin lysiinin aminoryhmään. Tällaiseen kohtaan kiinnittyessä yhdiste on stabiili myös vedettömissä olosuhteissa. (Hagan & Zuchner, 2011.)

Homogeenisissä määrittämenetelmissä, joissa valmiiksi sekoitettuun reaktioliuokseen lisätään vain näyte, on lantanidikelaattien käyttö mittaamisessa erittäin kätevää. Itse reaktioliuoksessa on usein paljon itsestään luminoivia molekyylejä, joiden vaikutus voidaan jättää huomioimatta, koska mittausviive on pitkä, jolloin taustasignaalin vaikutus pienenee radikaalisti.

4.5 QRET

Deasetylaatiota mitattiin Turun yliopistossa kehitetyllä sammutusresonanssienergian-siirto, QRET (*quenching resonance energy transfer*) –menetelmällä. Mittausta varten P8b-peptidi oltiin leimattu Europium-kelaatilla. QRET perustuu sitoutuneen kohdemolekyylin ja sitoutumattoman, lantanidikelaatilla eli tässä työssä europiumilla leimatun ligandin erotukseen. Kun leimattu ligandi on vapaana liuoksessa, europium on suorassa kosketuksessa liukoisen sammuttimen kanssa, jolloin monitoroidaan hyvin matala aika-erotteinen luminesenssi (TRL) signaali. Kohdemolekyylin eli peptidisubstraatin ja europiumin peptidin sitoutuminen häiritsee sammutin/Eu –vuorovaikutusta, kasvattaen näiden välimatkaa. Tämä kasvanut välimatka alentaa energian siirtoa europium-kelaatin ja sammuttimen välillä, täten nostaen Eu:n luminesenssin elinikää ja intensiteettiä. (Kopra & Härmä, 2015.)



Kuva 15. QRET-tekniikka sovellettuna deasetylaatiossa.

Kuvassa 15 on havainnollistava kaavio kuinka QRET-tekniikkaa hyödynnettiin tähän opinnäytetyöhön. Peptidisubstraatin asetaattiryhmä estää europium-leimatun peptidisubstraatin kiinnittymisen toisiinsa, jolloin europiumin olleena vapaana reaktioseoksessa sammutin (Q) hiljentää Eu:n luminesenssin, jolloin luetaan matala TRL-signaali. Pep1:een liitettyjen asetaattiryhmän johdosta europium-leimattu P8b ei pysty muodostamaan leusiinivetoketjua. Tällaisessa tilanteessa europiumin lähettämä luminesenssi ei häiriinny, jolloin mitattu arvo on korkea. Ilman entsyymin lisäystä reaktioluokseen, nämä kaksi peptidiä pysyvät erillään.

Opinnäytetyössä käytettävä liukoinen sammutinmolekyyli tilattiin QRET Technologies Oy:ltä. Sammutin oltiin valittu siten, että sen absorptiospektri ylittää deasetylaatiassa käytettävän europiumin kelaatin emissiospektrin. Sammuttimena käytettiin työssä Quench III:a. Sammutin alentaa europiumin luminesenssia, josta aiheutuu matala TRL-signaali. Sammutin on valonarka molekyyli, ja se tulikin pitää valolta suojattuna folioon peitettynä, jotta reagenssin sammutuskyky ei vähentyisi.

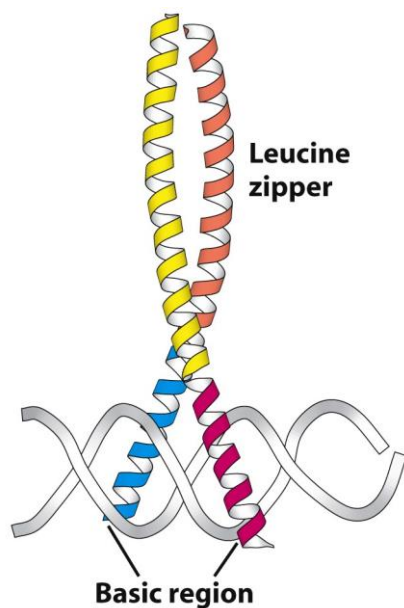
5 TYÖN ALKUVALMISTELUT

Opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä asetaattiryhmän irrottamiseksi peptidisubstraatilta. Deasetyylitransferaasina käytettiin Sirtuin 1 –entsyymiä ja reaktion inhiboimiseen EX-527 –inhibiittoria. Reaktiota varten Sirtuin 1 vaatii toimiakseen NAD(+):a. Varsinaisen reaktion lisäksi jokaiseen analyysiin sisällytettiin kontrollireaktio, josta saatiin reaktion vertailuarvot. Tuloksen antaa reaktioliuokseen lisätyn Eu-peptidin ja sammuttimen yhteisvaikutus. Jokaiselle reaktiolle tehtiin myös inhiboitu reaktio, jonka signaalista tulisi saada samanarvoinen kuin kontrollireaktiosta. Reaktiosta määritettiin signaalin ja taustan suhde. Tämän arvon ollessa vähintään kolme, voidaan todeta reaktion tapahtuneen ja menetelmän toimivan.

5.1 Peptidisubstraatin valinta

Deasetylaatiota varten käytettävät peptidisubstraatit valittiin kesällä aikaisemmin projektin parissa työskennelleen työntekijän alkututkimuksien perusteella. Natalia Tong Ochoa: 072015. Tutkimuksessa määritettiin, millä peptidillä saavutettiin paras signaalin ja taustan suhde sekä millä konsentraatiolla. Tutkimuksissa selvisi, että paras tulos saavutettiin käyttämällä Pep1 ja P8c –peptidejä.

Peptidit oli valittu tarkoin siten, että niiden sekvenssit vastaavat toisiaan, ja että niiden on mahdollista muodostaa keskenään leusiinivetoketju, jota menetelmässä käytettiin hyväksi.

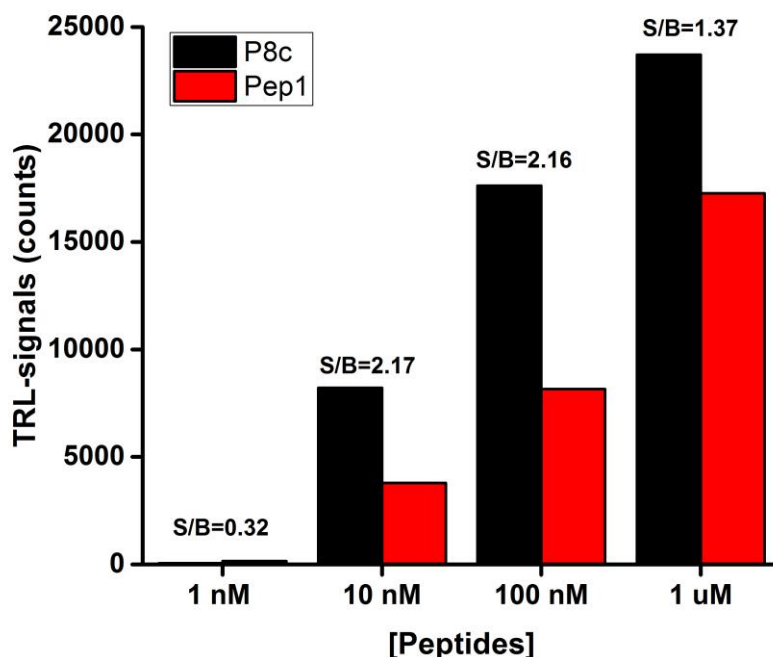


Kuva 16. Leusiinivetoketjun perusrakenne (Oregon State University, 2012).

Leusiinivetoketju kiinnittyy geenin promoottorialueelle tehden geeniin muokkauksia. Jos deasetylaatiota tapahtuu solussa liian usein, eli jos entsyymi on liian aktiivinen, voi seurauksena olla liian monta muokkausta yhdessä geenissä, ja tästä saattaa aiheutua komplikaatioita tulevaisuudessa, kuten esimerkiksi syöpiä.

Leusiinivetoketju muodostuu, kun kaksi aminohappoketjua, joiden joka seitsemäs aminohappo on leusiini, yhdistyvät toisiinsa. Sekvenssejä tutkittaessa oli otettu huomioon

valitun	entsyymin,	Sirtuin	1:n,	toimintaperiaate.
---------	------------	---------	------	-------------------



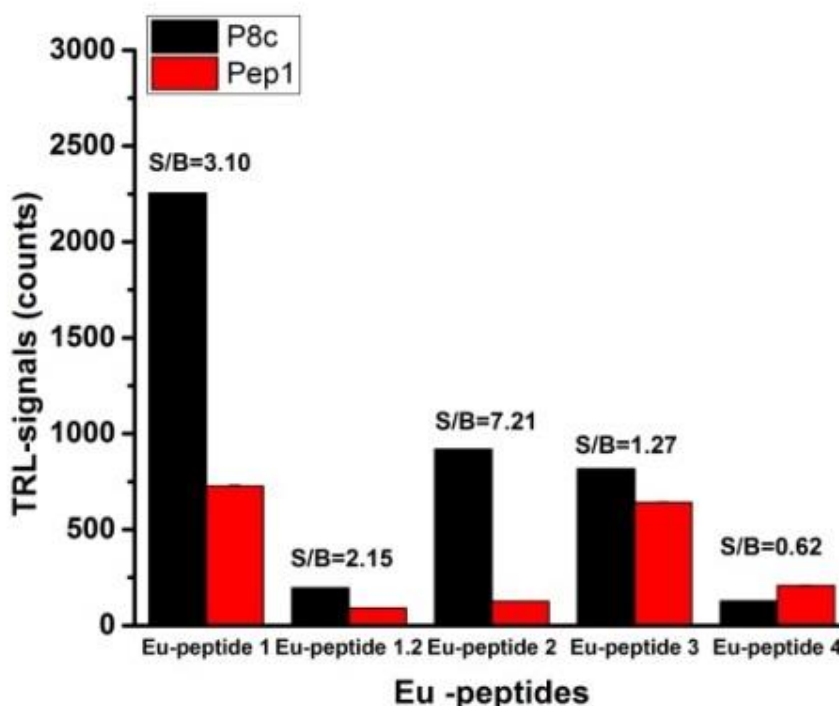
Kuva 17. Peptidisubstraatin valinta. Pep 1 ja P8c titrattiin Eu28 –peptidin kanssa, jotta saatiin selville mikä konsentraatio antaa parhaan S/B –lukeman.

Peptidit titrattiin, jotta saatiin selville, millä molaarisuudella saadaan optimoitua paras signaalin ja taustan suhde. Reaktiossa käytettiin puskurina samaa deasetylaatiopuskuria kuin mitä tulevaisuudessa määrityksissä käytettiin. Reaktiossa käytettyjen peptidien konsentraatiot näkyvät kuvassa 17 X-akselilla, 1 nM ollessa pienin käytetty konsentraatio ja 1 μM ollessa suurin. Konsentraatiot on ilmoitettu lopullisessa reaktioliuoksessa, jonka tilavuus yhdessä kuopassa oli 50 μl. Yhden nM:n konsentraatiolla ei saavutettu kunnon tuloksia. Luetun TRL-signaalin katsottiin olevan hyvä silloin, kun taustan lukemaksi saatiin 80–100 yksikköä. Taustalla tarkoitetaan tässä kohdassa aseteloidun Pep1:n aiheuttamaa signaalia Eu-peptidin ja sammuttimen lisäyksen jälkeen. Kuvassa signaalit nousevat melko korkealle, sillä tässä analyysissä käytettiin eri Eu-peptidiä, jolla on erilainen affiniteetti eli sitoutumiskyky käytettyjen P8c ja Pep1 –peptidien kanssa. Signaalin ja taustan suhde pysyy samassa suhteessa vaikka Eu-leimattua peptidiä vaihdettaisiinkin; yllä olevan analyysin tuloksien perusteella siis määritettiin ainoastaan, millä konsentraatioilla näiden kahden peptidin välinen S/B –arvo saataisiin suurimmaksi. S/B -arvon on oltava vähintään kolme, jotta voi-

daan olettaa reaktion onnistuneen ja menetelmän olevan toimiva. Todettiin, että analyysissä käytettävän peptidin/peptidien loppukonsentraatio liuoksessa on oltava vähintään 10 nM. Varsinaisessa deasetylaatio-tutkimusosassa käytettiin peptideille konsentraatiota 20 nM sekä Pep1:lle että P8c:lle. Europium-leimatun peptidin loppukonsentraatio oli 5 nM. Pienempi konsentraatio selittyy sillä, että liian suurella konsentraatiolla peptidiä olisi liuoksessa vapaana, jolloin mitattu luminesenssi olisi huomattavasti korkeampi; näin saadaan varmistuttua, että varmasti kaikki Eu-peptidi on sitoutuneena kohdepeptidisubstraattiin.

5.2 Eu-peptidin toimivuus määrittämisessä

Kun oikeat peptidisubstraatit oli valittu, tehtiin europium-leimatuille peptidiehdokkaille sitoutumistestit analyysissä käytettävien peptidien kanssa. Sitoutumistesteissä käytettiin samoja reaktiopuskureita ja reagensseja, mitä varsinaisessa analyysissä tullaan käyttämään.



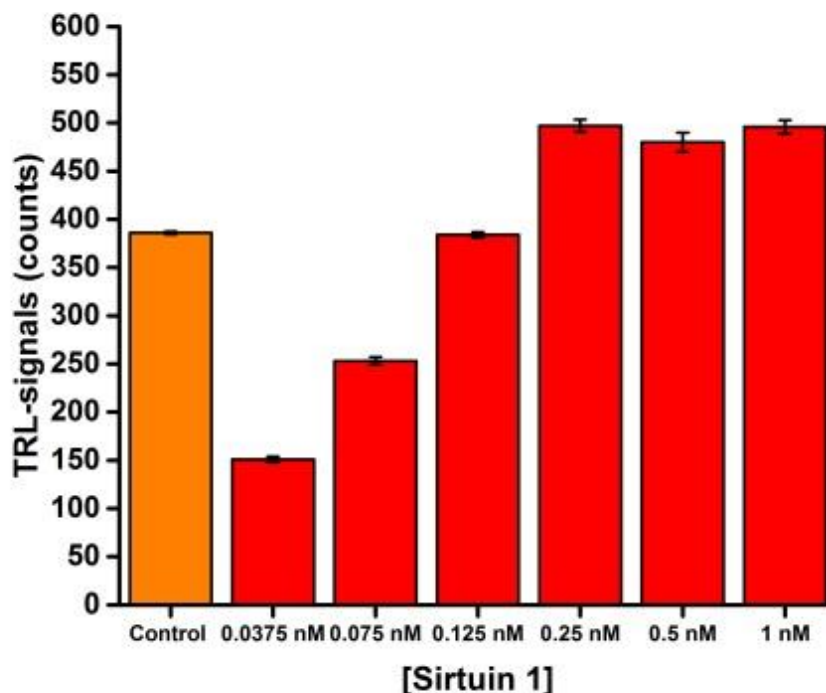
Kuva 18. Eu-peptidien S/B -arvojen tarkastelu.

Kuvan Eu-peptidi numero 2 tuotti parhaan taustan ja signaalin suhteen sammuttimen lisäyksen jälkeen. Eu-peptidi 1 ja 1.2 eroavat toisistaan siten, että ne kerättiin saman peptidinäytteen eri fraktioista puhdistettaessa se HPLC –laitteella. Deasetylaation tutkimiseen päätettiin käyttää europium–peptidiä numero 2, johtuen parhaasta signaalin ja taustan suhteesta 7,21. Affiniteettitestaus tehtiin Eu-peptidien ja Pep1-peptidin välillä. Mustat palkit kuvaajassa ovat P8c-peptidin ja Eu-peptidin välinen reaktio, joka tuottaa korkeamman TRL-signaalin kuin Pep1:llä ja Eu-peptidillä, sillä Pep1:n sekvenssin sisältämän asetaattiryhmän vuoksi leusiinivetoketjun muodostuminen on epätodennäköistä tai vastaavasti se muodostuu, mutta vain pieni osa leusiineista kiinnittyvät keskenään, tällöin kyseessä on vain osittainen sitoutuminen.

5.3 Entsyymien ja inhibiittorin valinta

Työssä oltiin päätetty käyttää deasetyylitransferaasina SignalChemilta tilattua Sirtuin 1 –entsyymiä. Tämän pohjalta etsittiin oikea inhibiittori, joka estää entsyymien normaalin toiminnan. Kirjallisuutta tutkimalla päätettiin käyttää selektiivisenä inhibiittorina EX-527:ä, jonka toimintaperiaate on selitetty edellä. Entsyymien molekyylipaino 84 kDa ja sen aktiivisuus 0,1 g/min/mol. Aktiivisuusarvoa hyödynnettiin tutkimuksen alussa, kun haluttiin tietää, kuinka paljon entsyymiä tarvitaan kaikkien asetaattiryhmien irrottamiseen.

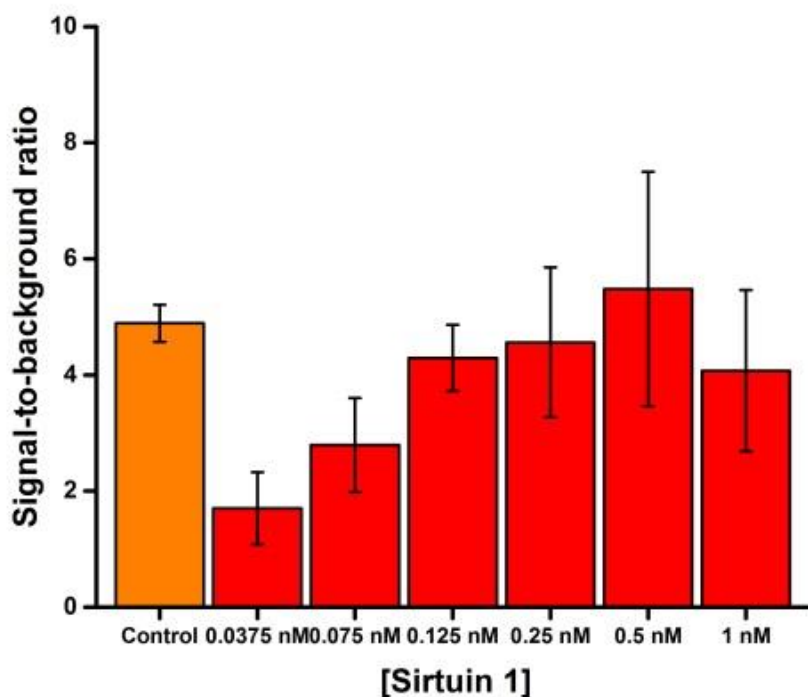
Entsyymi titrattiin parhaimman konsentraation selvittämiseksi, eli suurimmasta konsentraatiosta laimennettiin hyvin pieni pitoisuus ja selvitettiin, mikä pitoisuus on toimivin:



Kuva 19. Sirtuin 1 -entsyymin titraus. Tulokset TRL-signaaleina.

Entsyymistä tehtiin laimennokset 0,0375 – 1 nM, jotta saatiin selvitettyä konsentraatio, jolla saavutetaan analyysissä paras suorituskky. Konsentraatioilla 0,25–1 nM aika-erotteinen luminesenssi antaa lähes samat arvot, jotka ovat kontrollireaktiota korkeammat. Kontrollireaktiona toimi P8c ja P8b –peptidien välinen sitoutumisreaktio. Kontrollireaktiota korkeammat signaalit voivat selittyä sillä, että liian suuri entsyymikonsentraatio vaikuttaa tuloksiin aiheuttaen ylimääräisiä signaaleja. Opinnäytetyön tulevissa analyyseissä päätettiin käyttää 0,125 nM konsentraatiota Sirtuin 1:lle, sillä sillä saavutettiin sama tulos kuin kontrollireaktiolla. Tästä voitiin päätellä, että asetaattiryhmät ovat irronneet peptideistä ja leusiinivetoketjut ovat päässeet muodostumaan.

Samasta titrauksesta tehtiin myös toinen kaavio, jossa selvitettiin, mikä oli inhiboidun reaktion ja ilman inhibiittoria tapahtuneen reaktion signaalin ja taustan suhde. Inhiboidussa reaktiossa inhibiittori EX-527 kilpailee kiinnittymisestä NAD(+) -kiinnittymisalu-eelle, jolloin deasetylaatio-reaktio ei tule onnistumaan.



Kuva 20. Sirtuin 1 -entsyymin titraus. Analyysissä oli mukana inhiboidut reaktiot, joista laskettiin signaalin ja taustan suhde

Tuloksien toinen tulkintatapa osoittaa myös, että käyttämällä konsentraatiota 0,125 nM, saavutetaan analyysissä tarpeeksi luotettavat tulokset reagensseja säästäen. Näitä yllä olevia tietoja hyödyntäen opinnäytetyön jatkoanalyysit tehtiin kaikki 0,125 nM entsyymikonsentraatiolla. Valmistajan, Cayman Chemicalsin ilmoittama inhibiittorin EX-527:n IC50 -arvo oli 98 nM.

5.4 Aktivaattori

Reaktiossa käytettiin Cayman Chemicalsilta tilattua aktivaattoria SRT1720:ta, joka on selektiivinen Sirtuin 1 -entsyymille. SRT1720 kiinnittyy Sirtuin 1:n aminotermiinalin katalyyttiselle alueelle alentaen Michaelis –vakiota asetyloiduilla substraateilla. Työssä käytettiin aktivaattorille suhteellisen korkeaa konsentraatiota, 5 μ M. Korkea konsentraatio selittyy sillä, että analyysiä varten haluttiin saada selville, parantaako aktivaattori re-

aktiota sitä nopeuttaen tai stabiloiden. Huomattavaa parannusta ei havaittu, kun verrattiin rinnakkain reaktiota ilman aktivaattoria ja sen kanssa, joten aktivaattori päätettiin jättää lopullisesta reaktiosta pois.

5.5 QRET

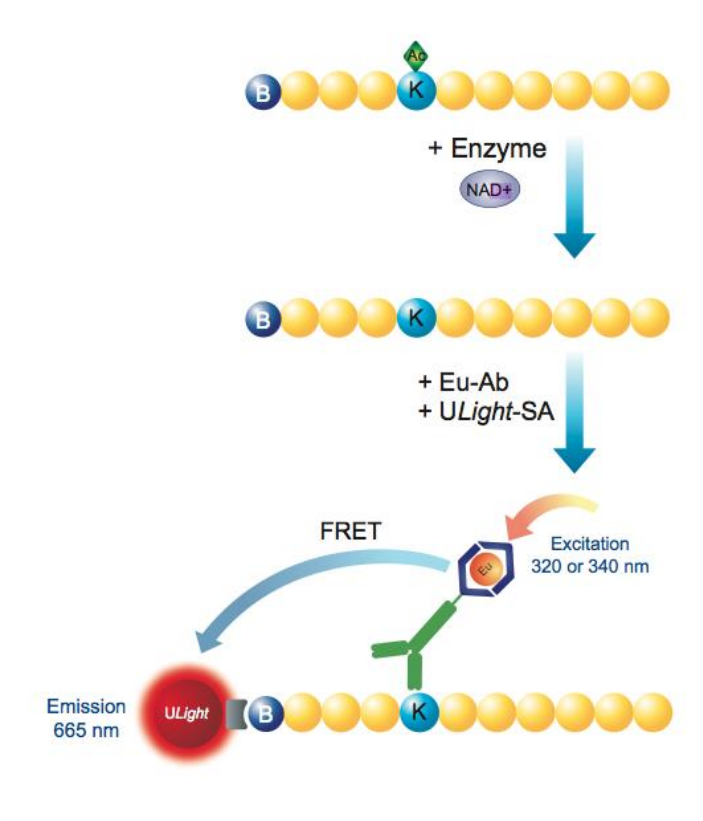
Deasetylaatiota mitattiin Turun yliopistossa kehitetyllä QRET (quenching resonance energy transfer) –menetelmällä. Mittausta varten P8b –peptidi oltiin leimattu Europium-kelaatilla. Europiumille olennainen emissioaallonpituus on 616 nm ja eksitaatioaallonpituus 340 nm. Käytetty mittausviive oli 400 μ s ja mittausikkuna oli 400-600 μ s:a viiveen jälkeen.

QRET mittaa aikaerotteista luminesenssia reaktioliuoksessa. P8c, jonka sekvenssissä ei ollut asetaattiryhmiä, muodostaa ensin leusiinivetoketjun P8b:n kanssa. P8b:n lisäyksen jälkeen mitataan Eu–signaali, joka ennen sammuttimen (quencher) lisäystä antaa korkean signaalin, sillä mikään ei tässä tapauksessa häiritse europium-kelaatin luminesenssia. Tämän jälkeen reaktioliuokseen lisättiin sammutinta, ja TRL-signaali monitoroitiin uudelleen. Sammuttimen lisäyksen vaikutuksesta europium-kelaatin ja sammuttimen etäisyys toisistaan kasvaa peptidien ollessa leusiinivetoketjussa. Tämä alentaa energian siirtoa, mikä aiheuttaa Eu:n luminesenssin kasvua, jolloin mitattu TRL on korkea.

Pep1:een liitetyn asetaattiryhmän johdosta europium–leimattu P8b ei pysty muodostamaan leusiinivetoketjua, johtuen asetaattiryhmän läheisestä sijainnista sekvenssin leusiini-aminohappojen kanssa. Ilman sammutinta tällaisessa tilanteessa europium-kelaatin luminesenssi ei häiriinny, jolloin mitattu arvo on korkea. Ilman entsyymin lisäystä reaktioliuokseen, nämä kaksi peptidiä pysyvät erillään. Kun P8b lisättiin ja monitoroitiin TRL –signaali, saadaan tulokseksi yhtä suuri luku kuin P8c:n ja P8b:n välisessä reaktiossa. Vasta sammuttimen lisäyksen jälkeen saadaan signaali, joka on matala, johtuen europium-kelaatin ja sammuttimen lyhyestä välimatkasta liuoksessa.

5.6 LANCE –määrittäminen

Toinen, deasetylaation määrittämiseen tarkoitettu, tunnettu menetelmä on Perkin Elmerin LANCE *Ultra* SIRT1 Histone H3-Lysine 4 Deacetylase Assay. LANCE –menetelmän avulla voidaan määrittää deasetylaatiota asetyloidun biotinyloidun histoni H3 –peptidin neljännen leusiinin kohdalla. Erona QRET –menetelmään on Eu-leimatus vasta-aineen käyttö. LANCE:ssa Eu-Ab:n lisäksi reaktioluokseen lisätään *ULight*-Streptavidinia, joka aikaansaa energian siirtoprosessin (FRET) leimojen välillä ja luminesenssia luetaan aallonpituudella 665 nm. LANCE –menetelmässä käytetään samaa europium-kelaattia, kuin mitä opinnäytetyössä kehitetyssä menetelmässä.



Kuva 21. LANCE-määrittäminen.

Yllä olevassa kuvassa aminohappoketjun lysiini on asetyloitu, ja reaktioseokseen lisätään entsyymi ja NAD(+). Tämän jälkeen reaktioseokseen lisätään Eu-leimattu vasta-aine sekä *ULight*-Streptavidiniä, jonka FRET signaali mitataan.

QRET tarjoaa vasta-aineettoman määrittämenetelmän deasetylaation mittaukselle. Vasta-aineet ovat kalliita, varsinkin lääkeaineiden tehoseulontaa ajatellen. Menetelmä on lisäksi tarkka ja sillä saavutetaan hyvät ja luotettavat tulokset, jolloin sitä voidaan käyttää kilpailevana määrittämenetelmänä lääkkeiden tehoseulonnassa.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Menetelmässä käytettävät peptidisubstraatit valittiin sen perusteella, mitä entsyymiä käytetään. Peptidien sekvenssi koostuu alle viidestäkymmenestä aminohaposta, ollen täten proteiineja pienempiä. Peptidejä oli muokattu laboratorioissa siten, että niiden sekvenssit sisälsivät tiettyihin kohtiin lisätyn asetaattiryhmän. Asetaattiryhmä oli kiinnitetty kohtaan, jossa entsyymi saa sen parhaiten pilkottua peptidistä.

Reaktiota varten valmistettiin selektiivinen deasetylaatiopuskuriliuos, jonka pH säädettiin peptideille ja entsyymille sopivaksi. Deasetylaatiopuskuri valmistettiin ennen analyysin aloittamista ja säilytettiin 50 ml:n Falcon-putkessa jääkaapissa. Puskuri otettiin hyvissä ajoin ennen analyysin aloitusta huoneenlämpöön lämpiämään. Analyysissä tehtiin aina vähintään kolme rinnakkaista määritystä, joista laskettiin keskiarvo, CV-% ja S/B-arvo. S/B-arvon tuli olla vähintään kolme, jotta voidaan katsoa reaktion onnistuneen ja että sitä on mielekästä kehittää eteenpäin. Peptidit hankittiin PepMic Co:lta ja europium-leimaus suoritettiin yliopistolla.

6.1 Europium-leimattu peptidi P8b

P8b-peptidin Europium-leimaus tehtiin yliopistolla. Leimauksen jälkeen peptidi kuivattiin, liuotettiin uudelleen ja puhdistettiin HPLC-laitteella. Puhdistettu ja leimattu peptidi kerättiin kromatogrammin piikkien perusteella. Europium-leiman luminesenssi testattiin alkuvaiheessa UV-lampun alla lyhyen aikaa, jotta nähtiin, luminoiko näyte. Tämän jälkeen näyte kuivattiin, liuotettiin uudelleen ja sille suoritettiin testaukset QRET-menetelmän avulla mittaamalla TRL.

6.2 Sitoutumistestit

Ennen deasetylaatio-protokollan valmistamista tuli käytettäville peptideille tehdä sitoutumistestit. Peptideistä valmistettiin eri konsentraatioita deasetylaatiopuskuriin. Näillä testeillä saatiin varmennus siitä, mitkä konsentraatiot antavat parhaimman signaalin ja taustan suhteen sekä saatiin tietoa käytettävien peptidien affiniteeteistä.

Sitoutumistestit suoritettiin valmistamalla peptidiliuokset deasetylaatiopuskuriin haluttuun konsentraatioon. Yleisimmät työssä käytetyt lopulliset, reaktioliuokseen tulevien peptidien konsentraatiot laskettiin joko 10 nM tai 20 nM mukaan. Peptidiliuokset valmistettiin eppendorf–putkiin, joiden tilavuus vaihteli sitoutumistestin laajuuden mukaan. Liuosta peptidiä pipetoitiin protokollan mukaisesti, normaalisti mikrolitra-asteikolla. Mustalle 384–kuoppalevylle pipetoitiin aina yhtä näytettä kolmeen kuoppaan 10 µL rinnakkaismäärittystä varten. Kuoppalevy asetettiin levyravistelijaan ja inkuboitiin huoneenlämmössä noin 5 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen lisättiin europium–leimattua peptidiä kuoppiin 20 µL ja 5 minuutin inkuboinnin jälkeen mitattiin QRET–menetelmällä TRL. Mittauksien viiveaikana käytettiin 400 µs. Mittauksen jälkeen kuoppiin lisättiin valoherkkää sammutinta 20 µL, sen konsentraation ollessa 3 µM. Määrittelyn kokonaistilavuus oli 50 µL. Tämän jälkeen kuoppalevy suojattiin alumiinifoliolla inkuboinnin ajaksi. 8 minuutin inkuboinnin jälkeen mitattiin uudelleen TRL ja tuloksista luettiin parhaimman S/B –arvon antava yhdistelmä. Mittauksia jatkettiin siten, että tulokset luettiin levylukijalla 8, 20 ja 30 minuutin välein. Mittausten välissä kuoppalevy pidettiin valolta suojattuna alumiinifolion alla levyravistelijassa. Sitoutumistestien katsottiin onnistuneen, kun S/B –arvoksi saatiin yli 3, optimi arvon ollessa noin 4-6. Sitoutumistesteistä saatiin paras tulos peptideille Pep1 ja P8c 20 nM:n loppukonsentraatiolla.

6.3 Deasetylaatio–reaktio

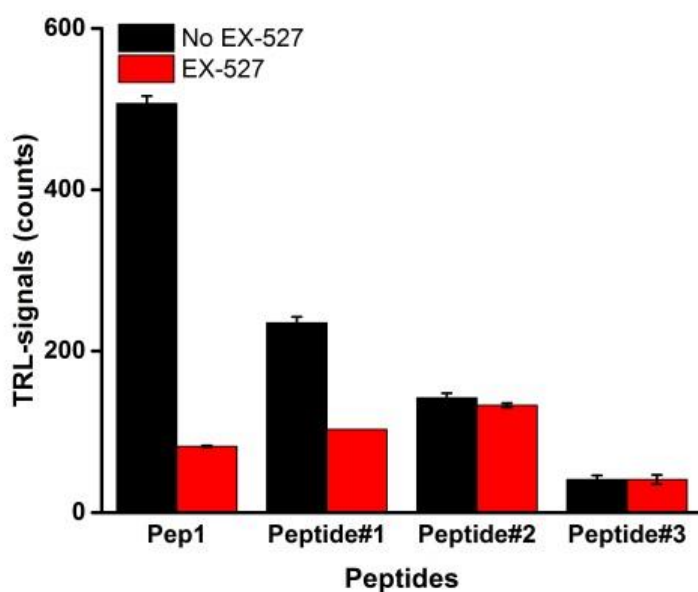
Kun sitoutumistesteistä oli saatu luotettavat tulokset ja oli päätetty, mitä peptidejä ja millä konsentraatiolla niitä käytetään reaktiossa, tehtiin ensimmäinen deasetylaatio–analyysi. Ensimmäisessä analyysissä testattiin, tapahtuuko reaktio, ja sen jälkeen menetelmää alettiin kehittämään muiden reaktiokomponenttien osalta. Reaktiota varten valmistettiin peptidiliuokset deasetylaatiopuskuriin kuten edellä sitoutumistesteissä, nyt peptideille Pep1, P8c ja P8b, siten, että lopullisessa reaktioliavuudessa peptidien konsentraatiot olivat 20 nM. Liuokset valmistettiin eppendorf –putkiin. Valmistettuja liuoksia säilytettiin jäähauteessa muiden työvaiheiden ajan. Seuraavaksi valmistettiin 500 µM:n NAD(+) –liuos. NAD(+), Sirtuin 1 ja inhibiittori EX-527 haettiin -80 °C:sta jäähauteeseen sulamaan.

Koska entsyymien aktiivisuus haluttiin pitää korkeimpana mahdollisena, siitä valmistettiin laimennokset viimeisimpänä. Entsyymi sulatettiin jäähauteessa ja siitä pipetoitiin aseptisesti 0,125 nM liuos deasetylaatiopuskuriin. Varsinaista määrittystä varten valmistettiin

erillisiin eppendorf-putkiin reaktioliuos, jota lisättiin aina 10 µl:a kuoppiin pipetointijärjestyksen mukaisesti. Ensimmäisessä analyysissä käytettiin suhteellisen korkeita entsyymipitoisuuksia verrattain korkeilla peptidipitoisuuksilla. Liuos vortexoitiin koeputkisekoittimella.

Inhibiittoria käsiteltiin varoen: Sigma-Aldrich luokittelee aineen erittäin vaaralliseksi, joten ainetta tuli käsitellä hanskat kädessä erityistä varovaisuutta noudattaen. Inhibiittori sulatettiin jäähauteessa kuten entsyymi, ja liuos valmistettiin samoja periaatteita hyödyntäen.

Pipetointijärjestyksen mukaisesti kuoppalevyille pipetoitiin aina kolme rinnakkaista näytettä. Ensin pipetoitiin reaktioliuos, joka sisälsi peptidit, inhibiittorin/deasetylaatiopuskurin, NAD(+):n sekä entsyymiin. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 20 µl:a Eu-peptidiä. Lyhyen huoneenlämmössä inkuboinnin jälkeen mitattiin ensimmäinen TRL-arvo, jonka jälkeen lisättiin 20 µl:a sammutinta, joka oltiin valmistettu myös deasetylaatiopuskuriin. Kun P8b lisättiin ja monitoroitiin TRL-signaali, saatiin tulokseksi yhtä suuri S/B -arvo kuin P8c:n ja P8b:n välisessä reaktiossa. P8c:ssä ei ole sekvenssiin liitettyjä asetaattiryhmiä, joten leusiinivetoketju pääsee vapaasti muodostumaan. Vasta sammuttimen lisäyksen jälkeen saatiin signaali, joka on matala, johtuen europium kelaatin ja sammuttimen lyhyestä välimatkasta liuoksessa. Sammutin estää europiumin luminesenssin, sillä sen absorptiospektri on päällekkäin europium kelaatin emissiospektrin kanssa.

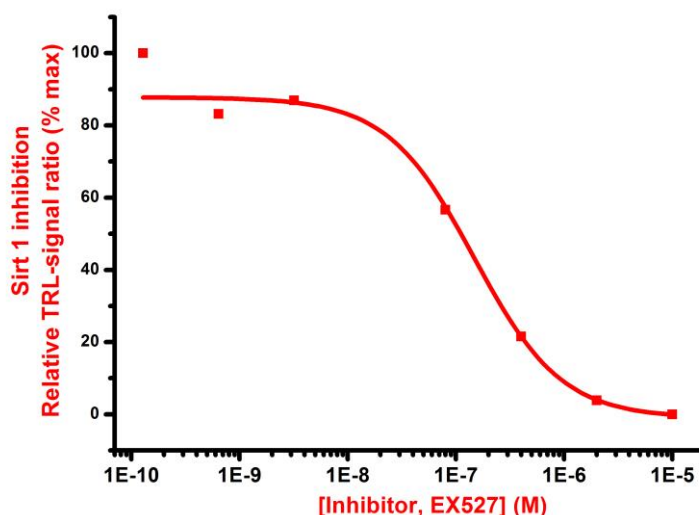


Kuva 22. Eri peptidisubstraattien vertailu.

Kuvassa 22 on tarkasteltu eri peptidisubstraattien välinen deasetylaatio-reaktio. Kaikki peptidit oli asetiloitu, ja reaktiossa käytettävät entsyymi, inhibiittori ja aktivaattori sekä muut reaktion komponentit ovat samat. Asetaattiryhmien paikka peptidiketjujen sekvensseissä vaihtelee.

6.4 Inhibiittorititraus

Opinnäytetyötä tehdessä oli mielekästä suorittaa inhibiittorille titraus, jonka piirretystä kuvaajasta saatiin määritettyä inhibiittorille ominainen IC₅₀-arvo.



Kuva 23. Inhibiittorititraus.

Inhibiittorista valmistettiin laimennossarja suuresta pitoisuudesta hyvin pieneen, ja muu reaktio pidettiin samana. Tällöin entsyymikonsentraatio ei muutu, ainoastaan inhibiittorin pitoisuus. Laimennokset valmistettiin eppendorf-putkiin ja valmiita liuoksia pidettiin jäähauteessa.

Kuvassa 23 on X-akselilla logaritmisella asteikolla inhibiittorin konsentraatio. Pienellä konsentraatiolla entsyymin inhibitio oli melko olematonta. Mittaukset suoritettiin aikavälillä 8 min, 20 min ja 30 min sammuttimen lisäyksen jälkeen. Kuvaajasta saatiin määritettyä IC₅₀-arvo, jota käsitellään myöhemmin Tulokset-kohdassa.

6.5 Entsyymititraus

Kuvassa 19 (s. 29) on entsyymille suoritettu titraus. Analyysi tehtiin samalla periaatteella kuten inhibiittorititraus, ja siitä selvitettiin millä konsentraatiolla saadaan lopullista analyysiä varten tarpeeksi hyvät ja luotettavat tulokset.

Titrausta varten valmistettiin 20 nM liuokset peptideistä, Sirtuin 1 -entsyymistä laimennussarja 0,0375 nM → 1 nM muiden reagenssien loppukonsentraatioiden pysyessä samana. Koska tarkoituksena oli kehittää markkinoille kilpailukykyinen, herkkyydeltään ja selektiivisyydeltään luotettava määritysmenetelmä, oli pienimmän mahdollisen, toimivan entsyymikonsentraation etsiminen titraamalla järkevää. Näin saadaan analyysin lopullista hintaa laskettua vähentämällä vaadittujen reagenssien konsentraatiota ja optimoitua olosuhteet sen mukaisiksi.

6.6 Labrox-laite

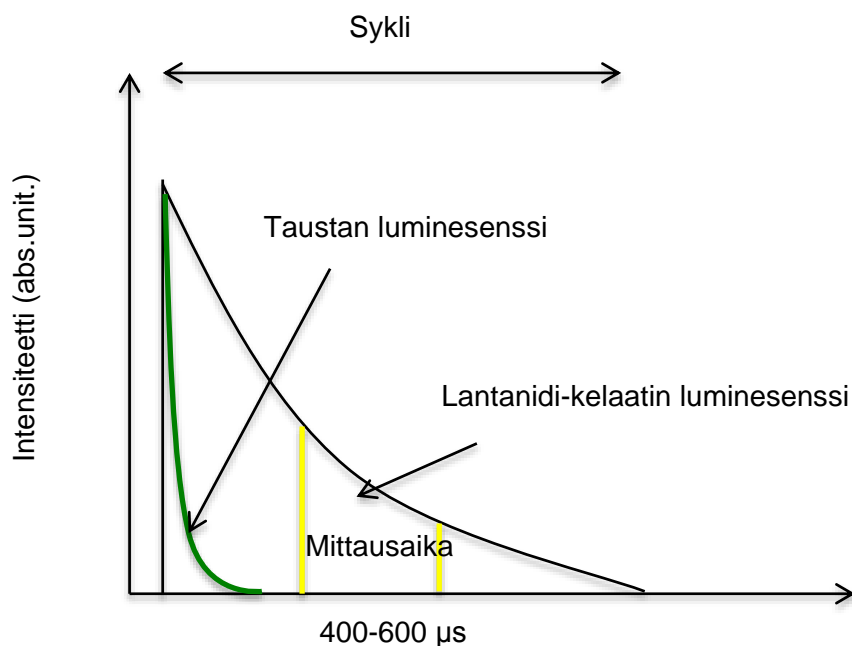
Reaktioiden luminesenssin mittaukseen käytettiin Labrox-laitetta. Labrox valmistaa levynlukijalaitteita. Labroxin levynlukijalla voi havaita useita erityyppisiä signaaleita, kuten absorbanssia, fluoresenssia, luminesenssia, aikaerotteista fluoresenssia ja fluoresenssin polarisaatiota hyvällä suorituskvyyllä. Laitteella pystyi valitsemaan monenko mikrosekunnin viiveellä mittaukset suoritettiin, mikä on hyvä, sillä mittausalue vaihtelee muun muassa käytetystä lantanoidikelaatista. (Labrox.fi.)



Kuva 24. Labrox-levynlukija (Labrox.fi).

6.7 TRL-signaalien tulkinta

Opinnäytetyössä käytettiin luminoforina europium-kelaattia. Luminoforien hyödyntäminen on varsin yleistä kehitellessä homogeenistä määrittysmenetelmää. Radioaktiivisia aineita ei tällöin tarvita signaalin määrittämiseen. Opinnäytetyössä lantanidi-kelaattina käytettiin europiumia. TRL-signaalilla tarkoitetaan aikaerotteista luminesenssia.

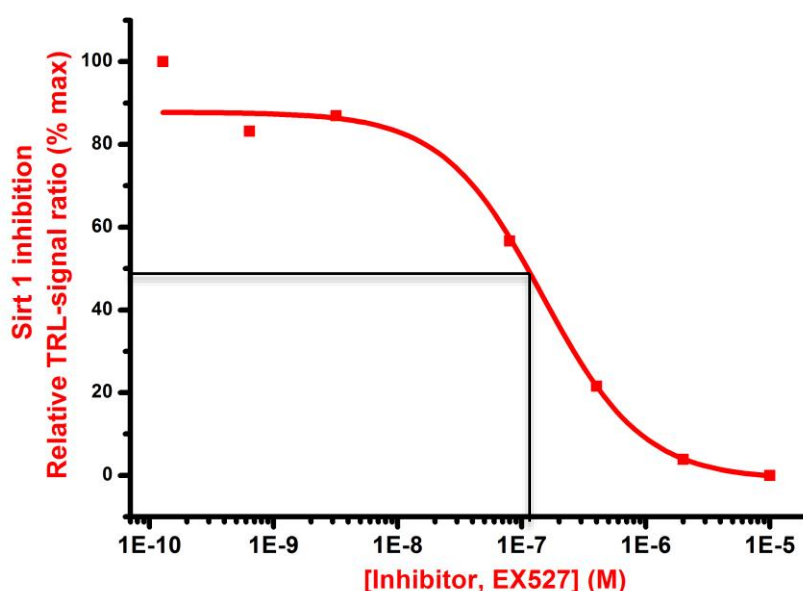


Kuva 25. Europium-kelaatin luminesenssin mittausalue.

Kuvassa 25 yhdellä syklillä tarkoitetaan eksitaatio-emissiokiertoa, joka taas mahdollisesti voi toistua uudelleen mittauksista riippuen. Jotta saavutettiin kunnolliset ja luotavat tulokset, tuli taustan TRL-signaalin olla välillä 80-100. Kuoppalevyn materiaali saattaa myös vaikuttaa tuloksiin materiaalin heijastavuuden vuoksi; tästä syystä käytettiin mustia 384-kuoppalevyjä heijastuksen minimoimiseksi. Mittauksen viiveenä oli yleisimmin 400 μ s:a, välillä vaihdellen 600 μ s:n. Lopulliset mittaukset suoritettiin 600 μ s:n viiveellä. Signaalin ja taustan suhde määritettiin halutun/tapahtuneen reaktion ja kontrollireaktion välillä. Jotta TRL-signaalit saatiin halutulle tasolle, tuli sammuttimen loppukonsentraatiota reaktioliuoksessa säätää siten, että taustan signaaliksi saatiin 80-100. Vasta tällä arvolla saatiin luotettava S/B -arvo.

7 TULOKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää toimiva inhibiittori Sirtuin 1 –entsyymin aiheuttamalle deasetylaatiolle, joka on yksi proteiinin jälkitranslaation muodoista. Opinnäytetyössä määritettiin inhibiittorin optimaalisinta toimintaympäristöä. Työssä tutkittiin myös kahta muuta inhibiittoria entsyymille, mutta heikoin tuloksin. Toinen käytetyistä inhibiittoreista oli Suramin Sodium ja toinen L002. Inhibiittoreita verrattiin analyysissä samankaltaisissa olosuhteissa EX-527:n kanssa, mutta reaktiossa ei havaittu inhibointia.



Kuva 26. Sirtuin 1 -entsyymin inhibitio.

Kuvasta 26 selviää, että inhibiittorikonsentraation ollessa noin 125 nM, entsyymin aktiivisuus on laskenut noin puoleen alkuperäisestä. Arvo saadaan lukemalla Y-akselilta 50 %:n kohdalta, missä kohtaa titrauskäyrään piirretty viiva leikkaa käyrän. X-akselilla on käytössä logaritminen asteikko, josta lukemalla saadaan inhibiittorin IC50-arvoksi 125 nM. Valmistajan eli Cayman Chemicalsin ilmoittama arvo oli 98 nM.

8 POHDINTAA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää homogeeninen deasetyylitransferaasi-määritysmenetelmä lääkeaineiden tehoseulontaa varten. Reaktio saatiin toimimaan, ja entsyymille löydettiin yksi toimiva inhibiittori. Reaktio-olosuhteet saatiin optimoitua, joka alentaa määrityksen lopullista kustannusta. Inhibiittorititrauskäyrästä saatu IC₅₀-arvo on tässä tapauksessa melko lähellä valmistajan ilmoittamaa, joten inhiboidun reaktion voidaan katsoa onnistuneen ilman komplikaatioita ja häiriötekijöitä ympäristöstä. Tämä arvo saavutettiin olosuhteissa, joissa NAD(+) –konsentraatio oli 500 µM, Sirtuin 1:n 0.25 nM ja inhibiittorin konsentraation ollessa 3 µM.

Opinnäytetyössä onnistuttiin löytämään toimiva inhibiittori deasetylaatiota aiheuttavalle Sirtuin 1 -entsyymille. Kirjallisuuden antama IC₅₀-arvo EX-527:lle on 98 nM, ja laskennalliseksi arvoksi saatiin 125 nM. Opinnäytetyössä onnistuttiin kehittämään vertailukelpoinen, vasta-aineeton määritysmenetelmä lääkeaineiden seulontaan, joka on kilpailukykyinen muiden markkinoilla olevien, kalliimpien menetelmien joukkoon.

Asetylaatiota tutkittiin myös opinnäytetyössä deasetylaation ohella, mutta siitä ei saatu kunnollisia tuloksia. Deasetylaatioissa saavutettiin hyvä signaalin ja taustan suhde, tulokset olivat välillä 4-6. Oikealla inhibiittorikonsentraatiolla onnistuttiin estämään deasetylaatio kokonaan.

LÄHTEET

- Acker, M.G. & Auld, D.S. 2014. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science*, Vol. 1:56-73.
- Aletta, J.M.; Cimato, T.R.; Ettinger, M.J. 1998. Protein methylation: signal event in post-translational modification. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 23, Issue 3, 89-91.
- BBC Bitesize- Higher Biology- Introducing Metabolism, 2016. Viitattu 14.5.2016. <http://www.bbc.co.uk/education/guides/zwnffg8/revision/2>
- Bisswagner, H. 2014. Enzyme assays.
- BostonBiochem, 2016. SUMO. Viitattu 2.4.2016. <http://www.bostonbiochem.com/products/sumo>
- Cantó, C. & Auwerx, J. 2012. Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD(+)? *Pharmacological Reviews*. 64:166–187, 2012
- Cayman Chemical, Protein Acetylation: Much More than Histone Acetylation. Viitattu 25.3.2016. <https://www.caymanchem.com/article/2152>
- Cornish-Bowden, A. 2013. The origins of enzyme kinetics. *FEBS Letters* 587(2013):2725-2730.
- Cornish-Bowden, A. 2014. Analysis and interpretation of enzyme kinetic data.
- Gano, L.; Donato, A.; Pasha, H.; Hearon, C.Jr.; Sindler, A. & Seals, D. 2014. The SIRT1720 reverses vascular endothelial dysfunction, excessive superoxide production, and inflammation with aging in mice. *American Journal of Physiology*, Dec 15; 307(12).
- GenScript. 2016. Protein Phosphorylation vs. ubiquitination in drug development. Viitattu 26.3.2016. <http://www.genscript.com/protein-phosphorylation-vs-ubiquitination.html>
- Gertz, M.; Fischer, F.; Thi Tuyet Nguyen, G.; Lakshminarasimhan, M.; Schutkowski, M.; Weyand, M. & Steegborn, C. 2013. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *PNAS*, Jul 23; 110(30).
- Goddard, J.P. & Reymond, J.L. 2004. Recent advances in enzyme assays. *Trends in Biotechnology*, Vol. 22 No.7 July 2004.
- Hagan, A.K. & Zuchner, T. 2011. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011 Jul; 400(9): 2847-2864. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3102841/#__ffn_sectitle
- Halling, P.J. & Gupta, M.N. 2014. Measurement and reporting of data in applied biocatalysis. *Perspectives in Science*, Vol. 1:98-109.

Härmä, H.; Rozwandowicz-Jansen, A.; Martikkala, E.; Frang, H.; Hemmilä, I.; Sahlberg, N.; Fey, V.; Perälä, M. & Hänninen, P. 2009. A New Simple Cell-Based Homogeneous Time-Resolved Fluorescence QRET Technique for Receptor-Ligand Interaction Screening. *Journal of Biomolecular Screening* 14(8); 2009

Johnson, K.A. 2013. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Letters* 587(2013):2753-2766.

Kanan, Y. & Al-Ubaidi, M.R. 2013. Tyrosine O Sulfation: An Overview. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*. 2013, Aug.

Kevin Ahern's Biochemistry at Oregon State University; Leucine Zipper. Viitattu 26.3.2016. <http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/geneexpressionoutline.html>

Kong, S.; Yeung, P. & Fang, D. 2013. The class III Histone Deacetylase Sirtuin 1 in Immune Suppression and Its Therapeutic Potential in Rheumatoid Arthritis. *J Genet Genomics*, July 20; 40(7): 347-354.

Kopra, K. & Härmä, H. 2015. Quenching resonance energy transfer (QRET): a single-label technique for inhibitor screening and interaction studies, *New Biotechnol.* (2015)

Labrox, Plate Reader-Labrox. Viitattu 25.3.2016. <https://www.labrox.fi/products/plate-reader>

Minor, R.; Baur, J.; Gomes, A.; Ward, T.; Csiszar, A.; Mercken, E.; Abdelmohsen, K.; Shin, Y-K.; Canto, C.; Scheibye-Knudsen, M.; Krawczyk, M.; Irusta, P.; Martín-Montalvo, A.; Hubbard, B.; Zhang, Y.; Lehmann, E.; White, A.; Price, N.; Swindell, W.; Pearson, K.; Becker, K.; Bohr, V.; Gorospe, M.; Egan, J.; Talan, M.; Auwerx, J.; Westphal, P.; Ellis, J.; Ungvari, Z.; Vlasuk, G.; Elliot, P.; Sinclair, D. & de Cabo, R. 2011. SIRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Scientific reports*, 2011; 1:70.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>

Nakoshima, T. 2005. Leucine zippers. *Encyclopedia of life sciences*.

PhosphoSitePlus, SIRT1(Human), 2013. Viitattu 14.5.2016. <http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=5946&showAllSites=true>

NCBI, MMDB, Protein Structure Summary, 41G9, 114862. Viitattu 18.5.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=114862>

Prabakaran, S.; Lippens, G.; Steen, H. & Gunawardena, J. 2012. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *WIREs Syst Biol Med*, 4: 565-583.

Singh, R.; Singh Yadav, B.; Singh, S.; Pandey, P.N. & Mani, A. 2016. *In-silico* screening of *Schistosoma mansoni* Sirtuin1 inhibitors for prioritization of drug candidates. SpringerPlus 2016, 5:286 March 2016.

Sun, Y.; Zhou, H.; Zhu, H. & Leung, SW. 2015. Ligand-based virtual screening and inductive learning for identification of SIRT1 inhibitors in natural products. Scientific Reports, Vol 6.

Thermo Fisher Scientific, Phosphorylation. Viitattu 14.3.2016. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>

Turkmen, K.; Karagoz, A. & Kucuk, A. 2014. Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. World J Diabetes, Dec 15; 5(6): 894-900. Viitattu 20.3.2016.

www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265877/

Yogita, K. & Muayyad, R-Al.U. 2013. Tyrosine O-sulfation: An Overview. JSM, July 19. <http://www.jscimedcentral.com/Biotechnology/Articles/biotechnology-1-1003.php>